



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2011

**Marina Raquel
de Almeida
Matos**

**Avaliação da toxicidade do mercúrio com um
sensor potenciométrico**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2011

**Marina Raquel
de Almeida
Matos**

**Avaliação da toxicidade do mercúrio com um
sensor potenciométrico**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica da Professora Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes, Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e co-orientação da Dra. Alisa Rudnitskaya, Investigadora Auxiliar do CESAM do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho à minha família e amigos.

o júri

presidente

Professor Doutor Dmitry Victorovitch Evtyugin

Professor Associado com agregação da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes

Professora Associada da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Alzira Yamasaki

Professora Adjunta IV da Universidade Federal de Pelotas

Doutora Alisa Rudnitskaya

Investigadora auxiliar do CESAM da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Queria agradecer às minhas orientadoras Doutora Teresa Gomes e Doutora Alisa Rudnitskaya pelo apoio, disponibilidade e conhecimentos que me transmitiram ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Queria agradecer à Doutora Adelaide Almeida, Doutora Ângela Cunha e Eliana Alves, pelo apoio e ajuda prestados ao longo da realização deste trabalho.

Queria agradecer aos meus familiares, em especial os meus pais, e amigos pelo carinho demonstrado e pela ajuda prestada.

Palavras-chave Mercúrio, especiação, atividade, ISE, luminescência, toxicidade aguda e crónica

Resumo

O objetivo deste trabalho consistiu na aplicação de um eletrodo seletivo ao mercúrio, para a deteção do mercúrio na água do mar em níveis de atividade correspondentes à toxicidade aguda na biota. Biodisponibilidade e, conseqüentemente, a toxicidade do mercúrio no ambiente aquático dependem de sua forma química. O mercúrio inorgânico, é associado à concentração ou atividade dos iões Hg^{2+} . Dois métodos de avaliação da toxicidade do mercúrio em meio salino foram empregados: potenciometria, com os eletrodos de membrana de vidro calcogeneto seletivos para o mercúrio, e um teste biológico baseado na luminescência da bactéria marinha *Vibrio fischeri*. Os eletrodos seletivos ao mercúrio foram calibrados em soluções com diferentes conteúdos de cloreto e outros ligantes, e em diferentes valores de pH. O sensor respondeu na gama de atividades de mercúrio de 10^{-4} a $10^{-23} \text{ mol L}^{-1}$ e com um limite de deteção na água do mar artificial de $2,65 \times 10^{-24} \text{ mol L}^{-1}$. A toxicidade da água do mar artificial enriquecida com mercúrio, foi medida usando bactéria luminescente *V. fischeri*. Toxicidade aguda do mercúrio nestas condições, corresponde à atividade de $3,72 \times 10^{-24} \text{ mol L}^{-1}$ ($t = 10 \text{ min}$). O sensor potenciométrico com membrana de vidro calcogeneto, pode ser aplicado para a deteção da atividade de mercúrio correspondente à toxicidade aguda, apesar de esta atividade ser muito próxima do limite de deteção do sensor. As duas amostras recolhidas na Ria de Aveiro não apresentaram toxicidade para *V. fischeri*, assim, foi-lhes adicionado mercúrio. O comportamento de ambos os sensores e da bactéria nas amostras de água do mar real, foi diferente em comparação com as soluções de água do mar artificial, salientando que esta última não é adequada para a calibração. Verificou-se que o limite de deteção do sensor potenciométrico na água real não permitiu a deteção da atividade do mercúrio, correspondente à toxicidade aguda.

Keywords Mercury, speciation, activity, ISE, luminescence, acute and chronic toxicity

Abstract The objective of this work was application of the mercury-selective electrode to the detection of the mercury in the seawater at the activity levels corresponding to the acute toxicity to the biota. Bioavailability and consequently toxicity of the mercury in the aquatic environment depends on its chemical form. For inorganic mercury it is associated with concentration of Hg^{2+} ion or activity. Two methods of assessment of mercury toxicity in saline media were employed: potentiometry with the mercury-selective electrode with chalcogenide glass membrane and biologic test based on the luminescence of the marine bacterium *Vibrio fischeri*. Mercury-selective electrodes were calibrated in the solutions with different content of chloride and other mercury complexing ligands and different pHs. Sensor has shown response in the range of the mercury activities 10^{-4} - 10^{-23} mol L⁻¹ and detection limit in the artificial seawater of $2,65 \times 10^{-24}$ mol L⁻¹. Toxicity of artificial seawater spiked with mercury was measured using luminescent bacterium *V. fischeri*. Acute toxicity of mercury in this conditions corresponds to its activity of $3,72 \times 10^{-24}$ mol L⁻¹ (t = 10 min). Potentiometric sensor with chalcogenide glass membrane can be applied to the detection of mercury activity at the level of acute toxicity though this activity is very close to the detection limit of the sensor. Two samples collected in the Ria de Aveiro were found not to be toxic to *V. fischeri*, thus they were spiked with mercury. Behavior of both sensor and bacterium in the real seawater samples was different compared to the artificial seawater solutions, stressing that the latter are not adequate for calibration. It was found that detection limit of potentiometric sensor in the real water does not allow detection of mercury on the activity level corresponding to the acute toxicity.

Índice

Índice	I
Lista de Tabelas	III
Lista de Figuras	IV
Notação	VI
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Metais de transição na água do mar	3
2.2. O mercúrio	3
2.2.1. Fontes	4
2.2.2. Formas	4
2.2.3. Efeitos no homem e organismos aquáticos	8
2.3. Métodos para determinar a toxicidade	10
2.3.1. Métodos biológicos	10
2.3.2. Métodos químicos	13
2.3.3. Sensores potenciométricos	14
2.3.3.1. Potencial de Membrana	16
2.3.3.2. ISE	19
2.3.3.3. Eléctrodo selectivo ao mercúrio com membrana de vidro calcogeneto	20
3. Materiais e Métodos	23
3.1. Reagentes	23
3.2. Preparação das soluções	23
3.2.1. Soluções tampão de pH e padrões de cloreto	23
3.2.2. Preparação de padrões de mercúrio para a calibração dos eléctrodos	23
3.2.3. Preparação de soluções de mercúrio em água do mar artificial	25
3.3. Recolha e tratamento das amostras da água da Ria de Aveiro	26

3.4. Amostras da água da Ria de Aveiro da Barra com adição de mercúrio	27
3.5. Medições com os sensores potenciométricos	28
3.6. Avaliação da toxicidade do mercúrio usando a bactéria <i>V. fischeri</i>	29
3.6.1. Metodologia e preparação do meio, inoculação e repicagem da bactéria... ..	29
3.6.2. Calibração: luz emitida vs número de colónias	32
3.6.3. Medições da luminescência com a bactéria <i>V. fischeri</i>	33
4. Análise e Discussão de Resultados	355
4.1. Calibrações dos elétrodos seletivos a iões	35
4.1.1. Calibração dos elétrodos seletivos ao mercúrio	35
4.1.2. Calibração do eletrodo de pH e seletivo ao cloreto	36
4.2. Efeito pH na atividade do mercúrio livre	37
4.3. Calibração com os elétrodos seletivos em soluções tampão de mercúrio a pH 2 e pH 7	40
4.4. Calibrações com elétrodos seletivos ao mercúrio em água do mar artificial	43
4.5. Estabilidade ao longo do tempo das características dos sensores em contacto com soluções padrão salinas	44
4.6. Curva de calibração CUF vs luminescência	45
4.7. Estudo Da toxicidade do mercúrio na água do mar artificial	45
4.8. Água da Ria de Aveiro	50
4.9. Água da Ria de Aveiro com adição de Hg	53
5. Conclusão	59
6. Referências	61
Anexo	65

Lista de Tabelas

Tabela 1: Contribuição das fontes naturais e antropogénicas para o Mercúrio atmosférico. ^[7]	
.....	4
Tabela 2: Constante de estabilidade dos complexos de mercúrio. ^[15]	6
Tabela 3: Propriedades tóxicas de algumas formas de mercúrio no homem. ^[4]	9
Tabela 4: Atividade do mercúrio nas soluções com concentrações totais a variar entre 10^{-7} e 10^{-4} mol L ⁻¹ , para pH 2.....	24
Tabela 5: Soluções de mercúrio preparadas com pH igual a 2.....	24
Tabela 6: Soluções preparadas em água do mar artificial com salinidade 32	26
Tabela 7: Composição das soluções a estudar com salinidade 32.....	26
Tabela 8: Atividade do mercúrio adicionado à amostra da Ria de Aveiro da Barra.	28
Tabela 9: Atividade do mercúrio adicionado à amostra da Ria de Aveiro da Barra.	28
Tabela 10: A composição obtida para as amostras da água da Ria de Aveiro.	51

Lista de Figuras

Figura 1: Ciclo do mercúrio. ^[4]	5
Figura 2: Eléctrodo de referência do tipo prata-cloreto de prata. ^[38]	15
Figura 3: Sistema potenciométrico de eléctrodos seletivos a iões. ^[35, 40]	16
Figura 4: Curva de calibração de um eléctrodo. ^[37]	18
Figura 5: Eléctrodo de pH. ^[38]	19
Figura 6: Mapa da zona de recolha das amostras da água da Ria de Aveiro.....	27
Figura 7: Colónias de bactéria <i>V. fischeri</i> em placa.	30
Figura 8: Luminómetro usado na medição da luz emitida pela bactéria.	32
Figura 9: Reta de calibração para atividades de mercúrio livre.	35
Figura 10: Calibração do eléctrodo de pH.....	36
Figura 11: Resposta do eléctrodo seletivo do cloreto nas soluções de cloreto de sódio.	37
Figura 12: Efeito do pH na atividade do mercúrio livre para uma concentração total de $1,00 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹	38
Figura 13: Efeito do pH na concentração do mercúrio livre, Hg ²⁺ , para a concentração total de mercúrio de 10^{-6} mol L ⁻¹ , na presença de 0,11 mol L ⁻¹ de brometo e 0,48 mol L ⁻¹ de cloreto.Figura 13: Efeito do pH na concentração do mercúrio livre, Hg ²⁺ , para a concentração total de mercúrio de 10^{-6} mol L ⁻¹ , na presença de 0,11 mol L ⁻¹ de brometo e 0,48 mol L ⁻¹ de cloreto.	39
Figura 14: Efeito do pH na concentração do mercúrio livre, Hg ²⁺ , para a concentração total de mercúrio de 9×10^{-4} mol L ⁻¹ , na presença de 0,01 mol L ⁻¹ de brometo e 0,48 mol L ⁻¹ de cloreto.....	39
Figura 15: Reta de Calibração para as soluções tampão com pH igual a 2.	41
Figura 16: Reta de Calibração para as amostras tampão com pH igual a 7.	42
Figura 17: Gama de linearidade para o mercúrio livre.	43
Figura 18: Calibração em água do mar artificial.	44
Figura 19: Reta de calibração para a unidade formadora de colónias vs emissão de luz....	45
Figura 20: Efeito do mercúrio na emissão de luz da bactéria <i>V. fischeri</i>	46
Figura 21: Inibição para cada solução para os tempos 0, 10, 25, 55,85 e 130 minutos.	48
Figura 22: Inibição da luz emitida pela bactéria <i>V. fischeri</i> em função da atividade de mercúrio na água do mar artificial, para t = 10 e t = 25.	49

Figura 23: Potencial e inibição em função da atividade de mercúrio livre.	50
Figura 24: Resultados obtidos com a água da Ria de Aveiro na presença da bactéria <i>V. fischeri</i>	53
Figura 25: Potenciais obtidos para as amostras da água da Ria de Aveiro da Barra com adição de mercúrio.	54
Figura 26: Inibição da emissão de luz da bactéria <i>V. fischeri</i> para amostras da água da Ria de Aveiro da Barra com adição de mercúrio.	55
Figura 27: Inibição da luminescência para tempos de 0, 10, 25, 55, 85 e 130 minutos.	55
Figura 28: Inibição e potencial em função da atividade para água da Ria de Aveiro com adição de Hg.	56

Notação

$(\text{HOOCCH}_2)_4(\text{COOH})_2$	EDTA, Ácido etilenodiamino tetra-acético
a	Atividade
Ag^+	Ião prata
AgCl	Cloreto de prata
a_i	Atividade do ião i
a_i'	Atividade do ião i da solução externa do eletrodo
a_i''	Atividade do ião i da solução interna do eletrodo
BaO	Óxido de bário
Br^-	Ião brometo
$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	Glicerol
CaCl_2	Cloreto de cálcio
CaO	Óxido de cálcio
CFU	Unidade formadora de colónias
$\text{CH}_3(\text{COOH})$	Ácido acético
CH_3Hg^+ , MeHg	Metil mercúrio
CH_3HgCH_3 , $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$	Dimetil mercúrio
c_i	Concentração do ião i
Cl^-	Ião Cloreto
CO_3^{2-}	Ião carbonato
Cs_2O	Óxido de cézio
CVAAS	Espetrometria de Absorção Atómica de Vapor Frio
CVAFS	Espetrometria de Fluorescência Atómica de Vapor Frio
E	Potencial
$e.m.f.$	Força eletromotriz
E^0	Potencial padrão
E_{cell}	Potencial da célula
E_i^0	Potencial padrão do ião i
E_{ind}	Potencial da membrana
E_j	Potencial de junção líquida
E_{ref}	Potencial de referência
F	Constante de Faraday
F^-	Ião fluoreto
FMN	Mononucleótido de flavina
FMNH_2	Mononucleótido de flavina reduzido
H^+	Protão
H_2NCSNH_2	Tiourea
H_2O	Água
H_2O_2	Peróxido de hidrogénio
Hg(I) , Hg^+	Mercúrio (I)

Hg(II), Hg^{2+}	Mercúrio (II)
$\text{Hg(NO}_3)_2$	Nitrato de mercúrio
Hg(OH)_2	Hidróxido de mercúrio (II)
$\text{Hg}_{(p)}$	Mercúrio particulado
Hg^0	Mercúrio elementar
Hg1	Eléctrodo de mercúrio 1
Hg2	Eléctrodo de mercúrio 2
HgBr_2	Brometo de mercúrio
HgCl_2	Cloreto de mercúrio
HgNO_3	Nitrato de mercúrio
HgOH^+	Hidróxido de mercúrio
HgS	Sulfureto de mercúrio
HNO_3	Ácido nítrico
$\text{HOC(CH}_2)_2(\text{COOH})_2$	Ácido cítrico
HS^-	Ácido sulfídrico
HSCH_2COOH	Ácido tioglicólico
I	Força iónica
IC_0	Luminescência do controlo para t=0 minutos
IC_T	Luminescência do controlo para t=T minutos
INH	Inibição
ISE	Eléctrodo seletivo a iões
IT_0	Luminescência da amostra para t=0 minutos
IT_T	Luminescência da amostra para t=T minutos
KCl	Cloreto de potássio
K_{ij}^{pot}	Coefficiente de seletividade
KNO_3	Nitrato de potássio
La_2O_3	Óxido do lantânio
Li_2O	Óxido de lítio
LOD	Limite de deteção
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de magnésio hexahidratado
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de magnésio heptahidratado
$\text{N(CH}_2\text{COOH})_3$	Ácido nitrilotiacético
Na_2O	Óxido de sódio
NaBr	Brometo de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NAD(P)	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NAD(P)H	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
NaHCO_3	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	Glicina
NH_3	Amoníaco
n_i	Carga do ião i

$\text{NSC}_6\text{H}_4\text{COOH}$	Ácido tiosalicílico
O_2	Oxigénio
OH^-	Ião Hidróxido
PO_4^{3-}	Ião fosfato
R	Constante dos gases ideais
R-CHO	Aldeído
R-COOH	Ácido carboxílico
RLU	Unidade de luz relativa
rpm	Rotações por minuto
S^{-2}	Ião sulfureto
SiO_2	Dióxido de silício
SO_4^{2-}	Ião sulfato
T	Temperatura
γ_i	Coefficiente de atividade do ião i

1. Introdução

Existem diversos metais de transição no ambiente que são uma preocupação, pois têm grande impacto nos seres vivos. Um desses metais é o mercúrio, que é tóxico e apresenta diversos efeitos adversos para o homem e outros seres vivos, podendo mesmo provocar a sua morte. O grau de toxicidade do mercúrio depende da especiação do mesmo, que é influenciada pelo meio em que se encontra, pH, salinidade e condições redox.

Há diversos métodos usados na quantificação do mercúrio, no entanto, a aplicação dos métodos depende da forma do mercúrio que se pretende analisar, se livre, complexado ou concentração total.

A potenciometria mais concretamente os elétrodos seletivos a iões, é um dos métodos que poderá ser usado com algumas vantagens pois são menos dispendiosos e é um método simples. Uma vez que para os compostos inorgânicos em ambiente aquático a forma tóxica é o Hg^{2+} , os elétrodos foram utilizados para a deteção da atividade do mercúrio.

Além da quantificação do mercúrio, foi necessário estudar os seus efeitos tóxicos nos seres vivos, e consequentemente a determinação atividade do mercúrio correspondente à toxicidade aguda e crónica. De forma a relacionar a atividade do mercúrio com o seu efeito nos seres vivos, foram realizados ensaios biológicos. Estes ensaios consistiram na exposição de um organismo, a bactéria *V. fischeri* ao agente tóxico, o mercúrio. Estes ensaios biológicos foram realizados em água do mar artificial e em água da Ria de Aveiro recolhida em dois locais diferentes. As mesmas amostras foram analisadas por potenciometria.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Metais de transição na água do mar

Os metais de transição são uma das maiores preocupações a nível ambiental, pois não são biodegradáveis e transitam para formas orgânicas, que são as mais poluentes.^[1] No entanto, são essenciais para a vida das plantas, animais e do homem mas em quantidades reduzidas, caso contrário tornam-se prejudiciais.^[2]

Muitos destes metais são libertados de diversas formas para os diferentes meios. Por vezes, estes são difíceis de determinar, pois têm concentrações baixas.^[2] As metodologias usadas na sua determinação são diversas, com diferentes graus de precisão, o que dificulta a comparação de resultados de fontes distintas.^[2]

Os metais libertados para o oceano pelos diversos processos vão sobretudo para as zonas costeiras.^[2, 3] A água do mar contém concentrações baixas de quase todos os elementos. Em relação aos metais de transição, os que se encontram no mar e que merecem especial atenção são os seguintes: arsénio ($3,47 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$), selénio ($1,14 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$), manganésio ($7,28 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$), crómio ($3,85 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$), mercúrio ($7,48 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) e cádmio ($9,79 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$).^[3] Além dos metais de transição já referidos existem também o chumbo, ferro, zinco e cobre.^[2]

Devido à sua toxicidade para o homem e outros seres vivos, o mercúrio é um dos que merece especial atenção apesar de geralmente apresentar concentrações mais baixas que o resto dos metais comuns. O perigo que expõe os seres vivos depende da sua forma química.^[1-3]

2.2. O mercúrio

É o único dos metais que existe no estado líquido à temperatura ambiente.^[4] Tem uma temperatura de ebulição de $356,73^\circ\text{C}$ e congela a $-38,83^\circ\text{C}$, que resulta numa grande gama de temperatura em que este se apresenta no estado líquido.^[5]

O mercúrio apresenta as características típicas de qualquer metal, como a condução elétrica, o facto de ser brilhante, maneável e dúctil enquanto sólido, não é, no entanto, um bom condutor térmico.^[5]

2.2.1. Fontes

O mercúrio pode ser libertado para o ambiente como o resultado da atividade humana e devido a processos naturais.^[4, 6, 7] Na Tabela 1 pode ver-se a contribuição de algumas das principais fontes de mercúrio descarregado na atmosfera, anualmente.

Tabela 1: Contribuição das fontes naturais e antropogénicas para o Mercúrio atmosférico.^[7]

<i>Fonte</i>	<i>% total</i>	<i>Concentração de mercúrio ou emissão</i>	<i>Quantidade estimada de mercúrio descarregado na atmosfera global (tonelada/ano)</i>
Vulcões	1,0–1,4	28,0–1400,0 ng/m ³	60
Terra	16,7–22,7	1,0–6,0 ng/m ³	1000
Minas	0,2–2,3	1,0–5000,0 ng/m ³	10–100
Oceanos	13,3–45,4	1,0–3,0 ng/m ³	800–2000
Antrópicas	33,3–59,1	10,0–900,0 kg/ano	2000–2600

A libertação do mercúrio para o ambiente devido às causas naturais, resulta da evaporação do mercúrio que se encontra na superfície das águas oceânicas para a atmosfera, dos fogos florestais e das emissões vulcânicas^[4, 6, 7]

As causas antrópicas foram as que mais contribuíram para o aumento do mercúrio no meio ambiente, embora atualmente estejam mais controladas e tenham um menor impacto. Grande parte da contaminação antrópica provém da indústria, da produção eletrolítica de cloro e soda cáustica, da indústria plástica nas reações catalíticas, da indústria farmacêutica, da indústria mineral e da queima de combustíveis fósseis para a geração de eletricidade.^[4, 6]

2.2.2. Formas

Mercúrio é um dos contaminantes mais tóxicos que podem estar presentes no ambiente aquático e que consta da lista de poluentes prioritários da União Europeia. A biodisponibilidade e consequentemente a toxicidade do mercúrio, são definidos pela forma em que este se encontra. Assim, a especiação de mercúrio tem uma importância suprema para avaliação de toxicidade. Entende-se por especiação a distribuição do metal nas

diferentes formas que o mesmo pode apresentar, se está na forma inorgânica, orgânica, complexado a ligandos orgânicos ou inorgânicos. Especiação do mercúrio pode ser influenciada por diversos fatores como pH, temperatura, condições redox, salinidade, ligandos, entre outros, dependendo do tipo de ambiente em que se enquadra.^[7, 9]

De uma maneira geral, todas as formas de mercúrio são tóxicas, apesar de umas mais que outras.^[10] Este pode-se encontrar de forma livre ou complexada, dissolvido ou particulado, com ou sem carga, orgânico e inorgânico, em que os complexos com constituintes orgânicos apresentam um grau de toxicidade superior.^[6, 11, 12]

A forma química em que se apresenta é o fator determinante na sua biodisponibilidade, transporte, persistência e consequentemente, no impacto que tem para o homem.^[13] Na Figura 1 apresenta-se o ciclo do mercúrio no ambiente.

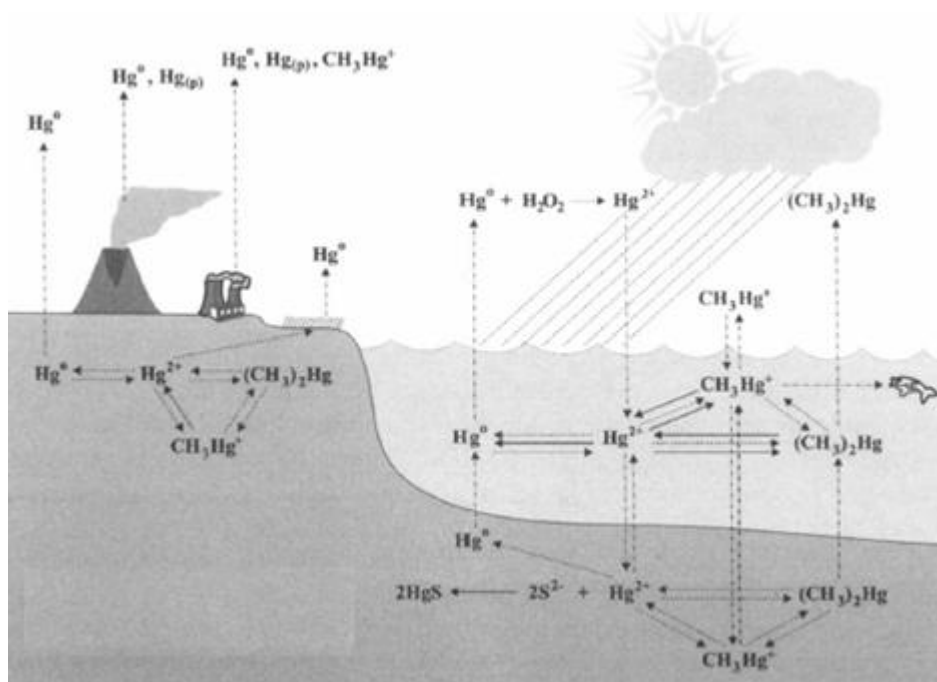


Figura 1: Ciclo do mercúrio.^[4]

O mercúrio existe em três estados de oxidação: Hg^0 , o mercúrio elementar, Hg^+ , o mercurioso, e Hg^{2+} , o mercurico.^[4] Verifica-se que o mercúrio elementar é a forma mais libertada para a atmosfera pelas fontes naturais e antrópicas.^[13]

O mercurico pode ser rapidamente reduzido à forma elementar, Hg^0 , por processos naturais, microorganismos ou fotoredução.^[7, 9] Esta redução é bastante importante devido à reatividade do Hg^{2+} , o que faz com que a sua disponibilidade para a metilação seja

menor.^[9] O seu estado de oxidação intermédio, Hg^+ , é instável e pouco solúvel em água, e consequentemente não se encontra neste ambiente.^[13, 14]

As formas mais importantes do mercúrio no ambiente são o mercúrio elementar, Hg^0 , o mercúrio (II), o metilmercúrio, CH_3Hg^+ , e o dimetilmercúrio, CH_3HgCH_3 .^[4]

Em geral, a concentração do metal na forma livre, Hg^{2+} , é muito baixa no ambiente aquático.^[14] Tal deve-se ao facto de ser uma espécie muito reativa, formando complexos estáveis com os ligandos orgânicos e inorgânicos.^[14, 15] Na Tabela 2 listam-se as constantes de estabilidade com o mercúrio, para os diferentes ligandos orgânicos e inorgânicos.

Tabela 2: Constante de estabilidade dos complexos de mercúrio.^[15]

<i>Ligando</i>	<i>Formula^a</i>	<i>HgL^b</i>		<i>HgL₂^b</i>	
		<i>log K^c</i>	<i>T; I^d</i>	<i>log K^c</i>	<i>T; I^d</i>
Cloreto	Cl^-	7,3	25; 0	14,0	25; 0
Carbonato	CO_3^{2-}	11,0	25; 0,5	-	-
Hidróxido	OH^-	10,6	25; 0	21,8	25; 0
Sulfato	SO_4^{2-}	1,3	25; 0,5	-	-
Brometo	Br^-	9,1	25; 0,5	17,3	25; 0,5
Fluoreto	F^-	1,0	25; 0,5	-	-
Amoníaco	NH_3	8,8	22; 2,0	17,4	22; 2,0
Sulfureto	HS^-	-	-	37,7	20; 1,0
Fosfato	PO_4^{3-}	9,5	25; 3,0	-	-
Ácido acético	$CH_3(COOH)$	3,7	24; 0,1	8,4	25; 3,0
Ácido cítrico	$HOC(CH_2)_2(COOH)_2$	10,9	25; 0,1	-	-
Ácido nitrilotriacético	$N(CH_2COOH)_3$	14,3	25; 0,1	-	-
EDTA	$(HOOCCH_2)_4(NCH_2)_2$	21,5	25; 0,1	-	-
Cisteína	$NSCH_2CH(NH_2)COOH$	14,4	25; 0,1	-	-
Glicina	NH_2CH_2COOH	10,3	20; 0,5	19,2	20; 0,5
Tiourea	H_2NCSNH_2	11,4	25; 0,5	22,1	25; 0,5
Ácido tiosalicílico	NSC_6H_4COOH	25,7	-	-	-
Ácido tioglicólico	$HSCH_2COOH$	34,5	25; 0,1	43,8	25; 1,0

a) a fórmula química para os ligandos orgânicos está no estado não ionizado, enquanto que as constantes de estabilidade são dadas para as formas completamente ionizadas; b) as constantes de estabilidade para os complexos HgL são para reações do tipo $[Hg^{2+}] + [L^{n-}] \leftrightarrow [HgL]^{n+2}$ e para os complexos HgL_2 a reação é $[Hg^{2+}] + [2L^{n-}] \leftrightarrow [HgL_2]^{n+2}$; c) as constantes de estabilidade são dadas para o Hg^{2+} livre; d) T é a temperatura em °C e I a força iónica em mol L⁻¹.

O mercúrio pode complexar com diversos ligandos inorgânicos, entre eles o cloro, hidróxido e sulfureto, que são os mais importantes pois controlam a especiação em ambientes aquáticos. A formação de complexo com o grupo hidróxido, como HgOH^+ e Hg(OH)_2 , irá dominar pois as águas não apresentam um pH baixo, ou seja, concentração do grupo OH^- é relativamente alta.

Perante valores de pH baixo, e/ou concentração elevada de cloreto, irá prevalecer os complexos com o cloreto, formando HgCl^+ e HgCl_2 . Ambos os complexos, quer com o hidróxido quer com o cloreto, apresentam constante de estabilidade com o mercúrio elevadas. Na presença de sulfureto dissolvido, há a possibilidade de complexar com este e formar sulfureto de mercúrio, visto que tem uma constante de estabilidade elevada.^[15]

Os complexos do mercúrio com compostos inorgânicos irão dominar em condições de alta salinidade e baixos conteúdos de matéria orgânica.^[16]

O mercúrio orgânico é aquele que está covalentemente ligado a pelo menos um átomo de carbono.^[4] Os complexos com compostos orgânicos derivam das transformações da forma inorgânica Hg^{+2} , no entanto, este processo depende do pH, das condições redox e da matéria particular.^[7]

Comparando os ligandos que contêm enxofre, como a cisteína e o mercaptoacetato, com os ligandos que contêm oxigénio, como o acetato e o EDTA, os primeiros apresentam uma maior afinidade em complexar com o mercúrio, e têm ligações mais fortes.^[15] Na presença de sulfureto dissolvido, uma espécie reduzida do enxofre, o mercúrio tende a complexar com este.^[15] Esta complexação com o enxofre que contenha grupos funcionais da matéria orgânica, justifica a grande afinidade e a forte ligação do mercúrio para composto orgânicos.^[15]

O mercúrio sofre metilação por ação de processos químicos ou biológicos originando CH_3Hg^+ e CH_3HgCH_3 , sendo que o primeiro prevalece em relação ao segundo, devido à sua bioacumulação.^[4, 7, 13] O processo de metilação pode ocorrer por ação das bactérias redutoras de sulfato, principalmente nas zona dos sedimentos onde a taxa de sulfato redutor é maior.^[3, 7] As bactérias produzem metilcobalamina que é o dador de metil ativo para complexar com o Hg^{2+} . Além destes, verifica-se a ocorrência de metilação em algas e intestinos dos peixes.^[7]

O metilmercúrio em termos de decomposição é inerte cineticamente. No entanto condições redutoras e salinidade elevada promovem este processo.^[9] Este mecanismo pode

ocorrer de modo eficaz através de dois processos: fotoquímicos ou por acção microbiana.^[9] Em relação ao processo por acção de bactérias verificam-se duas etapas, onde na primeira há a quebra do metil por acção de enzimas hidrolíticas e na segunda há a conversão do mercúrio iónico a elementar, através de uma enzima redutase.^[7]

A maior toxicidade dos composto orgânico de mercúrio deve-se à forte afinidade de Hg(II) e de organomercúrio com os grupos tiol, à tendência para formar ligações covalentes com moléculas orgânicas, à elevada estabilidade da ligação Hg-C, que resulta na baixa afinidade com oxigénio e, por fim, à forte disposição em maximizar a ligação com dois ligandos numa estereoquímica linear.^[4]

O destino final do metal em ambientes aquáticos, são os sedimentos.^[3] Daqui resulta que embora o uso industrial do mercúrio tenha diminuído, e consequentemente a sua libertação também, continua-se a verificar grandes concentrações nos sedimentos.^[17] Sendo assim, os sedimentos constituem a principal fonte de contaminação.^[8] Tal facto justifica-se pelo facto do composto ter grande afinidade com matéria suspensa.^[6] Apesar de a maior parte do mercúrio se encontrar depositado nos sedimentos, este pode ser re-suspenso, por tempestades ou fenómenos de elevada energia, o que leva a contaminação das áreas envolventes até a costa oceânica.^[8]

Um bom exemplo desta situação é a Ria de Aveiro, na Baía Laranjo em Estarreja, que apesar das descargas terem diminuído drasticamente, apresenta, em algumas zonas, valores elevados de mercúrio nos sedimentos, na gama de valores de 2,5 a 51,7 µg/g.^[8]

2.2.3. Efeitos no homem e organismos aquáticos

O mercúrio que se encontra em ambientes aquáticos, afeta quer os seres que nele habitam, quer os seres que tenham contacto com este ambiente direta ou indiretamente.

Nos peixes e organismo aquáticos presentes no mar, a acumulação do mercúrio depende da concentração trópica, idade e tamanho.

Os moluscos bentónicos e o zooplâncton, também absorvem o mercúrio orgânico e inorgânico da água do mar, no entanto, o mercúrio inorgânico é rapidamente eliminado pelo fitoplâncton por difusão passiva.^[6]

No caso dos peixes, mercúrio orgânico e inorgânico, é absorvido essencialmente através da passagem de água pelas guelras.^[6, 18] Os predadores de peixes irão acumular o

mercúrio devido ao seu consumo, sendo este o caso dos pássaros marinhos e mamíferos, e acumulam o mercúrio orgânico nos seus tecidos.^[6] A concentração de mercúrio total recomendada para proteção da vida aquática é de $7,98 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$, na água do mar.^[6]

Verificando-se concentrações elevadas de mercúrio nos seres aquáticos, tal irá afetar o homem que os consome. Além desta via de contaminação para o humano, constata-se também absorção ou inalação do composto resultante da exposição a zonas com elevados níveis de mercúrio.^[8] Para este caso, a concentração total de mercúrio recomendada é de $1,99 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$, na água do mar.^[6]

O metilmercúrio é considerado de todas as formas, a mais tóxica, pois esta é a única forma que se acumula a todos os níveis da cadeia alimentar, o que não se verifica com o mercúrio inorgânico.^[19] Tal justifica-se pela grande afinidade deste complexo com lípidos.^[20] Além disto, é uma espécie muito estável e tem boas propriedades que levam a penetração em organismos vivos.^[7] O metilmercúrio mesmo em baixas doses apresenta efeitos adversos, e embora seja a forma mais abundante nos organismos vivos, constitui uma fracção pequena do mercúrio total.^[3, 4]

Na Tabela 3 apresentam-se alguns dos efeitos no homem, de forma mais detalhada.

Tabela 3: Propriedades tóxicas de algumas formas de mercúrio no homem.^[4]

<i>Forma</i>	<i>Exposição</i>	<i>Efeito</i>
<i>Hg⁰</i>	Ocupacional: produção de termómetros, termóstatos e lâmpadas fluorescentes, extração de mercúrio.	Exposição severa: perda de memória, perturbações psicológicas e emocionais, danos nos rins. Baixa exposição: insónia, perda de apetite, distúrbios. Danos são reversíveis.
<i>Hg(I)</i>	Removido de uso médico. Uso raro.	Acroдинia Danos reversíveis.
<i>Hg(II)</i>	Antisséptico, indústria do couro, produção de baterias, uso em sabonetes e cremes clareadores.	Toxicidade crónica: distúrbios neurológicos. A exposição repetida a baixas doses afeta o sistema imunológico. A exposição aguda pode causar danos irreversíveis nos rins e indiretamente colapso cardiovascular.
<i>MeHg</i>	Produtos alimentares principalmente peixe e outros produtos marinhos.	Danos imediatos das células neuronais distúrbio sensorial, constrição do campo visual, surdez, distúrbios mentais, cólicas, paralisia

Devido a estes efeitos, a libertação por parte do homem, deste metal deve ser controlada. No entanto, nem sempre se respeitam as normas ambientais ou nem sempre se tem controlo sobre a libertação no que diz respeito as causas naturais.

A toxicidade pode-se representar de duas formas: crónica e aguda, que varia de espécie para espécie, consoante o metabolismo, idade, tamanho, entre outros.

A toxicidade crónica apresenta efeitos que permanecem um longo período de tempo, que para o ser humano, resultam em danos persistentes no sistema nervoso central, gastroentire, anemia, entre outros.^[21]

A toxicidade aguda apresenta efeitos adversos de duração determinada, tendo um curto período de tempo após a exposição. Os efeitos da toxicidade aguda verificam-se para concentrações de $2,49 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ no sangue, manifestando-se no sistema nervoso e imutintrário, bem como nos rins.^[21] Esta equivale à concentração efetiva do composto que provoca a mortalidade de 50% dos organismos.

2.3. Métodos para determinar a toxicidade

De forma a avaliar o impacto dos poluentes lançadas no ambiente por atividades humanas, é necessário realizar vários estudos com vista a determinar os seus limites aceitáveis e os seus efeitos nos organismos vivos. Tal pode ser alcançado através de diversos testes, entre eles os biológicos e os químicos.

2.3.1. Métodos biológicos

Os métodos biológicos são os mais populares para a avaliação de toxicidade, pois permitem obter informação direta sobre os efeitos nocivos dos poluentes nos seres vivos. Organismos de diferentes níveis tróficos têm sido utilizados: nematoides, cladóceros, peixes, algas, plantas e linhas de células cultivadas. Os testes relativos à toxicidade aguda são o primeiro passo para a determinação dos limites admissíveis, pois indicam a sensibilidade relativa das espécies e a concentração letal.^[22]

Os peixes, como a truta arco-íris e o vairão, podem ser usados para a determinação da toxicidade aguda. Estes ensaios apresentam boa sensibilidade e possibilitam uma boa análise em tempo real. Em geral, a aplicação deste método apresenta diversas

desvantagens, pois têm um tempo resposta prolongado, até 96h, e têm falta de reprodutibilidade.^[23, 24]

A utilização de macro invertebrados aplica-se na análise da toxicidade aguda, os mais utilizados são a *Daphnia* e a *Ceriodaphnia*, pois apresentam elevada sensibilidade e um ciclo de reprodução curto. Os ensaios da toxicidade com estes organismos são baseados na taxa de reprodução e de mortalidade.^[24]

As plantas e algas também podem ser usadas nos ensaios de toxicidade crónica, sendo em geral estes ensaios de baixo custo. No entanto, são ensaios morosos, levando de 2 a 4 dias.^[24]

Desde há vários anos, foram enfatizados os benefícios de usar ensaios bacterianos para a avaliação da toxicidade devido a sua rapidez, sensibilidade, reprodutibilidade e custo-eficácia. A vantagem adicional do uso das bactérias bioluminescentes, é um registo fácil dos efeitos dos poluentes sobre os organismos. Os ensaios de inibição de bioluminescência são muitas vezes escolhidos como o método de triagem de uma bateria de testes, com base na velocidade e no custo.

Os microrganismos apresentam diversas vantagens, como o facto de serem facilmente produzidos em grande escala, fáceis de manipular, e detêm de uma melhor viabilidade e estabilidade. Além disto, são aplicáveis a diversos valores de pH e de temperatura, e são dotados da capacidade de detetar diversas substâncias químicas.^[25, 26]

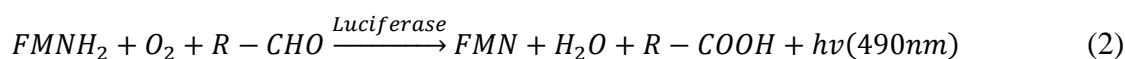
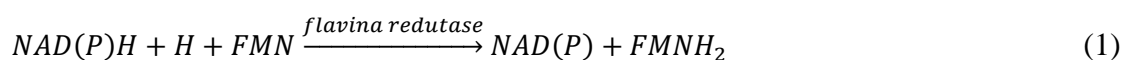
Neste tipo de ensaio estuda-se a inibição da luz pelo microrganismo na presença de um analito, e em simultâneo utiliza-se um dispositivo capaz de medir a resposta. Esta metodologia é interessante e útil, pois apesar de haver vários mecanismos de toxicidade nos diferentes organismos, quando se verifica toxicidade em um organismo menor, o mesmo se verifica em organismos superiores.^[23]

As bactérias luminosas estão amplamente distribuídas em ambientes marinhos, podendo mesmo ser encontradas em ambientes não marinhos.^[27] As bactérias marinhas são, geralmente, do género *Photobacterium*, *Beneckea* e *Vibrios*, e as não marinhas do género *Vibrios* e *Xenorhabdus*.^[27]

Para este tipo de teste, de luminescência com micro-organismos, pode-se usar as seguintes bactérias: *Vibrio fischeri*, *Vibrio harveyi* e *Pseudomonas* fluorescentes.^[23] A bactéria *V. fischeri* é a mais usada nos ensaios de toxicidade das águas.^[28] O presente estudo, será baseado no comportamento da bactéria *V. fischeri*, inicialmente denominada

como *Photobacterium fischeri*.^[29] Esta bactéria pode-se encontrar num ambiente marinho, quer numa relação simbiótica ou parasítica, quer em estado livre.^[30]

A bioluminescência refere-se à emissão de luz visível nos organismos vivos, que acompanha a oxidação de compostos orgânicos, luciferinas, que são mediadas por um catalisador de enzimas, a luciferase. A luminescência observada nesta bactéria é o resultado da luciferase gene-coded lux, que é o gene de luz mais comum observado neste tipo de organismos.^[23, 26] A reação de luminescência bacteriana, que é catalisada pela luciferase, envolve a oxidação de um aldeído alifático de cadeia longa e de FMNH₂, com a libertação de energia livre em excesso na forma de uma luz azul-verde a 490nm, conforme se pode ver nas equações que se seguem:



Neste processo, os compostos mais importantes e essenciais são o FMNH₂, e a cadeia de aldeídos.^[27] O FMNH₂ resulta da redução de FMN, em conjunto com o NAD(P)H na presença da *flavina redutase*. O FMNH₂ é um composto extremamente instável, e na presença do oxigénio juntamente com um aldeído de cadeia longa e da enzima *Luciferase*, que catalisa a reação, é oxidado a FMN. Daqui, resulta a emissão de luz verde-azul.^[30] O aldeído de cadeia longa é constituído por uma mistura de aldeídos com diferentes números de carbonos, e na reação é oxidado ao correspondente ácido.^[23, 27]

A expressão de luminescência em muitas bactérias é altamente dependente da densidade celular. As bactérias em estado livre no ambiente marinho não emitem a luz, a luminescência só é observada nas bactérias que são encontradas em altas densidades, como nos ambientes confinados dos órgãos luz de peixes ou lulas. Esta dependência da densidade das células pode ser ligada à molécula – auto regulador, denominado como auto-indutor lux, que proporciona comunicação entre as células e, portanto, permite a densidade da população. O auto-indutor na bactéria *V. fischeri* é o N-(3-oxohexanoil) homoserina lactona. A concentração da *V. fischeri* em estado livre na água do mar é inferior a 10² células/mL, e assim o auto-indutor difunde-se para fora das células, resultando numa ausência de luminescência observável. No entanto, num ambiente confinado como os órgãos de luz de certos peixes marinhos e lulas, onde a densidade

celular atinge 10^{10} a 10^{11} células/ml, o auto-indutor pode-se acumular e chegar a uma concentração crítica necessária para a ativação da transcrição de genes de luminescência resultando na síntese de enzimas específicas de luminescência.

A bioluminescência da bactéria *V. fischeri* pode ser afetada principalmente por três fatores: a temperatura, salinidade e pH. Caso não se verifiquem as condições ideais destes parâmetros, a sua emissão de luz será afetada, apresentada uma emissão inferior. O pH deve estar na gama de $7,3 \pm 0,2$. Em relação ao teor de sal, NaCl, as amostras devem ter 2 a 4%, ou seja, de 20 a 40 g L⁻¹, para manter pressão osmótica das células necessária para a emissão de luz natural.

Diferentes testes padrão têm sido desenvolvidos, como é o caso do teste Microtox, que emprega um princípio semelhante ao da bactéria *V. fischeri*.^[24]

2.3.2. Métodos Químicos

Há diversos métodos químicos para determinar as concentrações dos metais. Em geral, após a recolha da amostra é necessária a acidificação da mesma, para evitar a perda do mercúrio por volatilização ou adsorção nas paredes do recipiente.^[31]

O mercúrio inorgânico Hg^{II} após a sua redução a mercúrio elementar pode ser quantificado pela espectrometria absorção atômica de vapor frio, CVAAS, ou pela espectrometria de fluorescência atômica de vapor frio, CVAFS.^[13]

O método CVAAS é frequentemente aplicado e recomendado para a análise do mercúrio na água do mar. Para tal, é necessária a redução prévia do mercúrio ao estado elementar e a sua preservação com ácido nítrico a valores de pH inferiores a 2.^[6, 32]

A espectrometria de fluorescência atômica de vapor frio, CVAFS, exige o pré tratamento da amostra, que consiste na digestão com vista a transformar todo o mercúrio na forma livre inorgânica, Hg^{II}. Esta transformação é conseguida pela adição de um forte oxidante, como BrCl, a 70°C. De seguida há a redução do Hg^{II} à forma elementar, com vista a gerar o vapor frio de Hg⁰.^[13]

Estes geralmente são os métodos aplicados. No entanto, precisam de pré-tratamento da amostra seguido de uma separação ou pré concentração, que varia consoante a forma que se quer estudar e o meio de onde provêm. Em relação ao tratamento prévio pode-se

incluir a derivatização com tetraetilborato de sódio e complexação com cloreto. A separação pode-se efetuar através da cromatografia gasosa ou da cromatografia líquida.^[13]

Além destes, pode-se analisar com os sensores potenciométricos, que é um método menos dispendioso, rápido, simples e permite determinar a concentração do mercúrio na forma livre.^[33] Sugere-se, assim, a realização das análises da água do mar com sensores potenciométricos.

2.3.3. Sensores potenciométricos

A potenciometria atualmente é um meio de análise muito utilizado em diversas áreas. Pode ser aplicada em análises clínicas, análises ambientais e processos industriais.^[34, 35] É um método com diversas vantagens, pois tem um tempo de resposta curto, tem grande grau de aplicabilidade e são requeridos pequenos volumes de amostra.^[35]

Entende-se por potenciometria um método eletroquímico, que envolve a medição do potencial em função da atividade ou concentração de um determinado ião.

Uma célula potenciométrica é constituída por duas semi-células: uma de referência e uma indicadora, Esquema 1.^[34]

elétrodo de referência | ponte salina | solução amostra | elétrodo indicador

E_{ref} E_j E_{ind}

Esquema 1: Célula potenciométrica.^[34]

O elétrodo de referência é aquele cujo potencial é independente da composição da solução a analisar. Este fator é bastante importante, pois este elétrodo serve de base/referência na determinação do potencial da amostra, ou seja, o desvio verificado no elétrodo indicador será em relação a este.^[34, 36] Além disto, deve ser reversível, reprodutível e obedecer à equação de Nernst. Há vários tipos de elétrodos de referência, como o de prata-cloreto de prata e o de calomelano.^[34, 37]

O elétrodo de prata-cloreto de prata é um dos mais comuns e o utilizado neste trabalho, Figura 2. Este é constituído por um fio de prata ou platina prateado, revestido electroliticamente por uma fina camada de cloreto de prata, mergulhado numa solução de cloreto de potássio com concentração conhecida e saturada em cloreto de prata. Esta

saturação é alcançada por uma pequena adição de solução de nitrato de prata com concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.^[37]

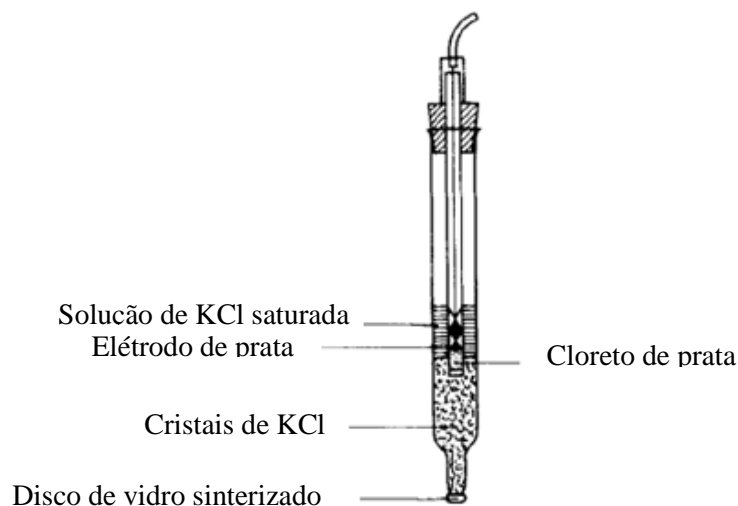


Figura 2: Eléttrodo de referência do tipo prata-cloreto de prata.^[38]

A ponte salina evita que os iões da amostra se misturem com os iões do eléttrodo de referência.^[34, 39]

O eléttrodo indicador é onde ocorre a troca de iões com a solução amostra, em que o seu potencial depende da atividade do ião em estudo.^[34, 37] Para a medição da atividade do mercúrio, os eléttrodos seletivos a iões são uma boa alternativa. Estes são constituídos por uma membrana, a interface através da qual ocorre a troca do ião em estudo.^[36]

Quer o eléttrodo indicador, quer o de referência estão ligados a um transdutor que converte para um sinal mensurável, o potenciómetro, Figura 3^[35, 36]

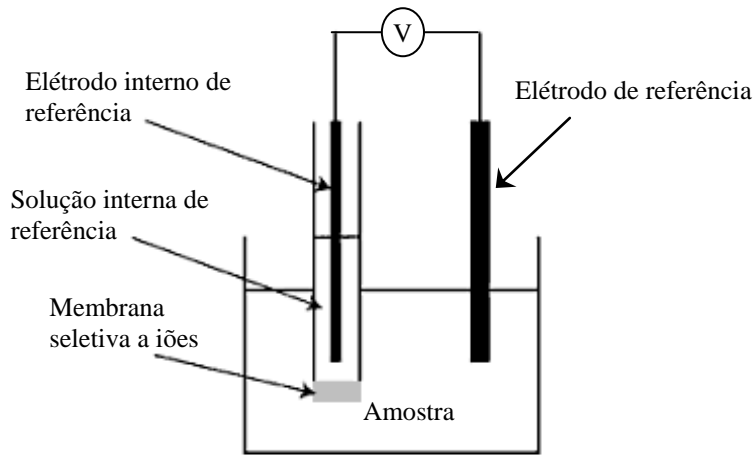


Figura 3: Sistema potenciométrico de eletrodos seletivos a iões. ^[35, 40]

2.3.3.1. Potencial de Membrana

O potencial resultante para um determinado ião é dado pela diferença de potencial dos eletrodos: ^[34, 36]

$$E_{cell} = E_{ind} - E_{ref} + E_j \quad (3)$$

em que E_{cell} é o potencial da célula, E_{ref} o potencial de referência, E_j o potencial de junção líquida e E_{ind} o potencial da membrana. ^[39]

Define-se E_j como o potencial da interface das soluções do eletrodo de referência e do eletrodo indicador. ^[37] Este fator resulta em problemas na resposta do sensor, de forma a simplificar opta-se por escolher um sensor em que esta variável seja nula ou ignorada. ^[39] Para tal, assegura-se a existência de uma ponte salina. ^[37] Com esta simplificação, a Equação (2) fica reduzida a: ^[39]

$$E_{cell} = E_{ind} - E_{ref} \quad (4)$$

Em relação a E_{ind} , é o que descrever a parte essencial, o que se passa na membrana do eletrodo e o movimento dos iões. ^[39] Para uma membrana seletiva somente a um tipo de ião i , é descrito da seguinte forma:

$$E_{ind} = \frac{RT}{n_i F} \log \left(\frac{a_i'}{a_i''} \right) \quad (5)$$

em que R a constante dos gases ideais, T a temperatura, n_i a carga do ião i , F a constante de Faraday, a_i' a atividade da solução externa e a_i'' a atividade da solução interna. ^[39]

Da combinação das diferentes parcelas que contribuem para potencial total, resulta a equação de Nernst, que relaciona a atividade da espécie em estudo com o seu potencial e com o eletrodo referencia:^[36, 39]

$$E = E_i^0 + \frac{RT}{n_i F} \log \left(\frac{a_i'}{a_i''} \right) \quad (6)$$

Assumindo e verificando que a composição da solução interna é constante e consequentemente a sua atividade, a_i'' , também, este termo torna-se desprezável, simplificando a equação anterior da seguinte forma:^[39]

$$E = E_i^0 + \frac{RT}{n_i F} \log(a_i') \quad (7)$$

Entende-se por atividade como a concentração efetiva de um composto num meio rodeado por outras moléculas, onde as interações entre as moléculas vizinhas o irão afetar.^[34, 37] A atividade, a_i , de uma solução relaciona-se com a concentração da seguinte forma:

$$a_i = \gamma_i c_i \quad (8)$$

em que c_i representa a concentração do ião i e γ_i o coeficiente de atividade do ião i .^[39]

O coeficiente de atividade é dependente da concentração e da carga iónica, e consequentemente, da força iónica. A força iónica é calculada segundo a seguinte equação:^[37]

$$I = 0,5 \sum c_i z_i^2 \quad (9)$$

O coeficiente de atividade pode ser calculado por diversos métodos, uns mais complexos que outros, entre eles a teoria de Debye-Huckel:^[37]

$$\log \gamma_i = \frac{0,505 z_i^2 I^{0,5}}{1 + 3,3 \times 10^7 a I^{0,5}} \quad (10)$$

O coeficiente de atividade, e consequentemente a atividade, variam com a força iónica.^[34] Para tal, é necessário manter a força iónica constante, de forma a ter uma relação linear entre a atividade e a concentração. Assim sendo, adiciona-se um eletrólito de concentração elevada á solução em estudo. Assim, a Equação (6) ganha nova forma:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \log(c_i) \quad (11)$$

No entanto quando ocorrem interferências de outros iões na amostra, a Equação de Nernst não é aplicável, neste caso verifica-se a Equação de Nicolsky:^[39]

$$E = E_i^0 + \frac{RT}{n_i F} \left[a_i' + \sum_{j \neq i} K_{ij}^{Pot} (a_j')^{z_i/z_j} \right] \quad (12)$$

O que distingue as duas equações é o fator de seletividade, K_{ij}^{Pot} , que é tido em conta nesta última, e a respetiva atividade de cada ião. Este fator pode ser determinado de diversas formas: método da solução separada, método de interferência fixa e método do ião primário fixo.^[39]

A reta de calibração de um eletrodo para um determinado ião, nas diferentes gamas de atividade, representa-se por uma curva constituída por duas zonas, uma zona linear e uma zona constante.

Na Figura 4, encontra-se uma representação gráfica da variação do potencial eletroquímico em função do logaritmo da atividade do ião.

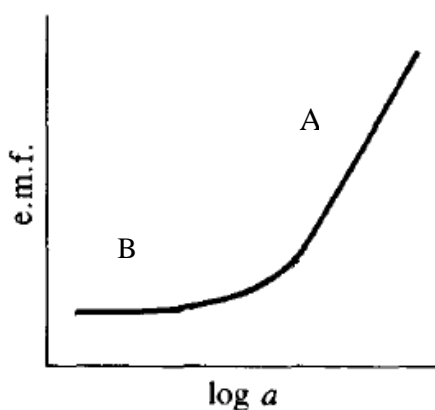


Figura 4: Curva de calibração de um eletrodo.^[37]

A zona da curva marcada com a letra A, corresponde à zona onde a resposta dos sensores será nernstiana, ou seja, terá uma declive de $2,303RT/nF$, em que n é a carga do ião.^[37] Quando a carga do ião é negativa, o declive da reta será negativo, e quando é positiva, o declive será positivo. Quanto maior for a carga do ião em estudo menor será o declive da reta. A parte da curva marcada com a letra B, corresponde à zona de atividades para o qual o sensor não responderá, pois está abaixo do seu limite inferior de deteção, LOD.^[37] Entende-se por LOD o logaritmo da atividade para o qual o seu potencial se desvia $18/n$ mV da resposta teórica, segundo as normas IUPAC.

2.3.3.2. ISE

Entende-se por ISE como elétrodos seletivos a iões, ou seja, são sensores seletivos para um determinado tipo de ião. Tal deve-se à existência de uma membrana na base do elétrodo, que só permite a passagem do ião em causa e não outro.

Há diversos tipos de membranas que podem ser de materiais de troca iónica, sólidas e líquida.^[38] Daqui resulta a divisão do tipo de elétrodo de membrana em três tipos: elétrodo de membrana de estado sólido, elétrodo de membrana líquida e elétrodo de membrana de vidro.^[41]

A composição da membrana de vidro difere consoante o ião a estudar, o mais comum de todos é elétrodo de pH, e serve de exemplo para este tipo. O elétrodo de pH é constituído por uma membrana seletiva para o qual só permeiam os iões de hidrogénio, em que o seu potencial é uma função linear da concentração deste ião, Figura 5.^[38] A sua membrana de vidro é constituída por 72% de SiO_2 , 22% de Na_2O e 6% de CaO , para quando trabalha com valores de pH a variar entre 1 e 9, caso contrário apresenta um erro elevado. Com vista a eliminar este erro e ser funcional para valores de pH superiores, surgiu uma membrana em que maior parte do sódio da sua constituição, é substituído por lítio, resultando assim, uma membrana com 63% de SiO_2 , 28% de Li_2O , 2% de Cs_2O , 4% de BaO e 3% de La_2O_3 .^[38]

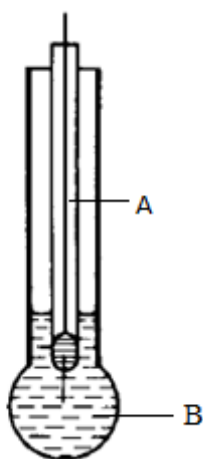


Figura 5: Elétrodo de pH.^[38]

Na sua constituição, na zona assinalada com a letra B tem ácido clorídrico, normalmente de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Além deste, tem um eletrodo de prata-cloreto de prata mergulhada no ácido, letra A.

Para que o eletrodo seja funcional é muito importante que a concentração do ácido nítrico que se encontra no interior do eletrodo não se altere. Caso esta se mantenha constante, o potencial do eletrodo de prata-cloreto de prata será também constante, que resultará, num potencial contaste entre o ácido nítrico e a parte interior da membrana do eletrodo. Quando mergulhado na solução com concentração a determinar, haverá um potencial gerado, entre a solução de estudo e a parte exterior da membrana do eletrodo.^[38]

Na interação entre a membrana e a solução em estudo, verifica-se dois processos: troca iónica e a difusão de todos os iões participantes.^[41]

Dentro das membranas de vidro, há diversos tipos de vidro a usar consoante o caso de estudo. Além deste tipo, existem membranas constituídas por outros materiais, como cristais e discos constituídos por material cristalino finamente pulverizado e prensado.^[38]

No presente trabalho será usado eletrodos seletivos a iões com membrana de vidro calcogeneto.

2.3.3.3. *Eléctrodo seletivo ao mercúrio com membrana de vidro calcogeneto*

A membrana de vidro calcogeneto é constituída por $\text{AgBr} - \text{Ag}_2\text{S} - \text{As}_2\text{S}_3 - \text{HgI}_2$.^[42, 43] Este sensor exhibe alta sensibilidade aos iões Hg^{2+} , com um baixo limite de deteção de $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e excelente seletividade na presença de iões de metais de transição com coeficientes de seletividade entre 10^{-5} e 10^{-7} .^[42, 44] De Marco et al, demonstraram que os eletrodos seletivos ao mercúrio exibiram respostas a iões Hg^{2+} , em solução tampão salina com concentrações de cloreto de sódio próximas da água do mar, numa gama de atividades de mercúrio entre 10^{-11} e $10^{-20} \text{ mol L}^{-1}$.^[43] O desempenho analítico reprodutível é estável e acompanhado por uma resposta do sensor não linear. Para concentrações de Hg^{2+} acima de $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, o sensor demonstra uma resposta com declive de 60 mV/pHg, que decresce para 30 mV/pHg numa gama de concentrações de 10^{-6} a $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$. Para atividades ultra baixas de iões de mercúrio, abaixo de $10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$, o declive diminui ainda mais para 20 mV/pHg.^[42]

Verificou-se que a resposta não linear do sensor em soluções de mercúrio é causada por, pelo menos, dois processos de geração de potencial: a troca de iões Hg^{2+} para Ag^+ e as

reações químicas na superfície da membrana que envolvem espécies de prata e de mercúrio.^[42] A baixa resposta do sensor nas soluções tampão salinas foi atribuída ao envenenamento de superfície da membrana pelo cloreto de sódio.^[43] O estudo da superfície do sensor de vidro calcogeneto num ambiente salino, revelou que a incrustação do eletrodo na água do mar sintética está ligada à formação de cloreto de prata pouco cristalino ou amorfo. Além disso, o mercúrio livre que se encontra em baixo nível de 10^{-14} mol L⁻¹, na solução tampão, poderá reagir com sulfeto de prata (I) na membrana, gerando sulfeto de mercúrio (II). Por outro lado, a incrustação do eletrodo é suavizada na água do mar real, compreendendo ligandos orgânicos naturais, que tem sido atribuída à peptização do cloreto de prata com os ligandos naturais surfatantes presentes na água do mar com pH 8.^[45]

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes

Água ultra-pura Milli-Q plus 185, água destilada, cloreto de sódio 99,5% ACS-ISO (NaCl) Merck, solução padrão de nitrato de mercúrio 1000ppm $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ BDH, brometo de sódio 99,0% ACS (NaBr) Panreac, agar Liofilchem, extrato de carne Merck, Glicerol 87% ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) Applichem, peptona de caseína Merck, hidróxido de sódio (NaOH) Panreac, solução de ácido nítrico 65% (HNO_3) Merck, nitrato de potássio (KNO_3) Panreac, cloreto de potássio 99,5% (KCl) Merck, cloreto de cálcio 95% (CaCl_2) ABSOLVE, cloreto de magnésio hexahidratado 99% ACS ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) Carlo ERBA Reagent, sulfato de magnésio heptahidratado 99,5% ACS ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) Carlo ERBA Reagent, bicarbonato de sódio 99,7% (NaHCO_3) Panreac.

Nos ensaios de luminescência foi usada a bactéria *V. fischeri* ATCC 49387 (USA), que se encontrava congelada em 10% de glicerol a -80°C .

3.2. Preparação das soluções

3.2.1. Soluções tampão de pH e padrões de cloreto

De forma a controlar o pH em todos os ensaios, prepararam-se soluções tampão de pH de 2, 4 e 7, por diluição de ampola comercial.

Na calibração do eletrodo seletivo ao cloreto, Cl^- , foram usadas soluções de NaCl com concentrações na gama de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ a 1 mol L^{-1} . Para tal, preparou-se uma solução de NaCl de 1 mol L^{-1} a partir de NaCl sólido, previamente seco. De seguida, fizeram-se diversas diluições da solução 1 mol L^{-1} para obter as restantes soluções pretendidas.

3.2.2. Preparação de padrões de mercúrio para a calibração dos eletrodos

Para a calibração do eletrodo seletivo ao mercúrio, foram preparadas várias soluções com diferentes gamas de atividade, pH e sais adicionais. As suas atividades foram

calculadas usando o programa MINTEQA (MINTEQA2 Model System Abstract, Allison et al., 1991; version 3.0)

Inicialmente foram preparadas soluções de mercúrio numa gama de atividades alta, com pH igual a 2, conforme as recomendações do fabricante do sensor seletivo ao mercúrio. Na Tabela 4 apresentam-se as concentrações das diferentes soluções e as respetivas atividades de mercúrio livre.

Tabela 4: Atividade do mercúrio nas soluções com concentrações totais a variar entre 10^{-7} e $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, para pH 2.

$\log(a(\text{Hg}^{2+}))$	$\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ (mol L^{-1})
-7,2	$1,0 \times 10^{-7}$
-6,2	$1,0 \times 10^{-6}$
-5,5	$5,0 \times 10^{-6}$
-5,2	$1,0 \times 10^{-5}$
-4,5	$5,0 \times 10^{-5}$
-4,2	$1,0 \times 10^{-4}$

De seguida, de forma a estudar o comportamento dos elétrodos nas soluções com atividades de mercúrio baixas, semelhantes às da água do mar, foram preparadas diversas soluções de mercúrio. Primeiro, foram preparadas soluções salinas com teor de cloreto de sódio típico da água do mar, para pH 2. Na Tabela 5 apresentam-se as composições das soluções.

Tabela 5: Soluções de mercúrio preparadas com pH igual a 2.

$\log(a(\text{Hg}^{2+}))$	$\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ (mol L^{-1})	NaCl (mol L^{-1})	NaBr (mol L^{-1})	KNO_3 (mol L^{-1})
-24,53	$1,0 \times 10^{-6}$	$4,0 \times 10^{-1}$	$1,5 \times 10^{-1}$	-
-22,54	$1,0 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-1}$	$1,5 \times 10^{-1}$	-
-21,49	$1,0 \times 10^{-3}$	$4,5 \times 10^{-1}$	$1,0 \times 10^{-1}$	-
-18,83	$1,0 \times 10^{-3}$	$4,5 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-1}$
-17,15	$1,0 \times 10^{-3}$	$4,5 \times 10^{-1}$	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-1}$
-14,82	$2,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-1}$	-	$4,0 \times 10^{-1}$
-13,30	$1,0 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^{-2}$	-	$5,0 \times 10^{-1}$

Com vista a ter soluções semelhantes à água do mar, em termos de salinidade, adicionou-se NaCl nas diferentes soluções. O mercúrio irá complexar com o cloreto, formando HgCl^+ e HgCl_2 , resultando numa baixa atividade de mercúrio livre na solução final. As soluções com atividades mais baixas de mercúrio, continham NaBr que irá também complexar com o mercúrio, formando HgBr^+ e HgBr_2 . Para as soluções com atividade de mercúrio mais elevada, isto é, com $\log(a(\text{Hg}^{2+}))$ superior a -21,49 e com concentração de NaBr mais baixa ou ausente, foi adicionado KNO_3 com vista em manter a força iónica constante.

A calibração do eletrodo foi efetuada para valores de pH de 2 e 7, com vista em avaliar a influência do pH no comportamento de eletrodo seletivo ao mercúrio. Verificou-se que a mudança de pH na presença dos ligandos Br^- e Cl^- não alterou a atividade do mercúrio livre, que foi confirmado com o cálculo das atividade via MINTEQA.

É de salientar que todas as amostras foram preparadas com uma antecedência de 24h em relação ao ensaio, de forma a se estabelecerem todos os equilíbrios químicos com os complexos.

3.2.3. Preparação de soluções mercúrio em água do mar artificial

Com vista a avaliar o comportamento do eletrodo de mercúrio na água do mar, foi preparada água do mar artificial, sendo esta constituída por: 24,72 g L^{-1} de NaCl, 0,67 g L^{-1} de KCl, 1,0269 g L^{-1} de CaCl_2 , 4,66 g L^{-1} de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 6,29 g L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,18 g L^{-1} de NaHCO_3 .^[46] Esta composição da água do mar artificial equivale a uma salinidade de 32, que corresponde à salinidade verificada na água da Ria de Aveiro da Barra. Nestas soluções também foram adicionados o nitrato de mercúrio e brometo de sódio, para assegurar a atividade de mercúrio baixa correspondente aos níveis de mercúrio livre típicos na água do mar.

As concentrações de nitrato de mercúrio e brometo de sódio nas soluções preparadas com a água do mar artificial para as medições com os eletrodos, encontram-se na Tabela 6, bem como o $\log(a(\text{Hg}^{2+}))$ calculado pelo programa MINTEQA.

Tabela 6: Soluções preparadas em água do mar artificial com salinidade 32 e pH 8.

$\log(a(Hg^{2+}))$	$NaBr$ ($mol\ L^{-1}$)	$Hg(NO_3)_2$ ($mol\ L^{-1}$)
-24,02	$1,1 \times 10^{-1}$	$1,0 \times 10^{-6}$
-22,87	$1,0 \times 10^{-1}$	$1,0 \times 10^{-5}$
-22,17	$6,5 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-5}$
-21,76	$5,0 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-5}$
-20,76	$5,0 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-4}$
-19,44	$2,0 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-4}$
-18,79	$1,0 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-4}$
-17,58	$1,0 \times 10^{-2}$	$9,0 \times 10^{-4}$

Além destas, foram preparadas outras soluções com uma gama de atividade inferior, conforme a Tabela 7, para usar nos ensaios biológicos. O potencial destas soluções também foi medido com os sensores potenciométricos.

Tabela 7: Composição das soluções a estudar com salinidade 32.

$\log(a(Hg^{2+}))$	$NaBr$ ($mol\ L^{-1}$)	$Hg(NO_3)_2$ ($mol\ L^{-1}$)
-24,02	$1,1 \times 10^{-1}$	$1,0 \times 10^{-6}$
-23,87	$1,0 \times 10^{-1}$	$1,0 \times 10^{-6}$
-23,79	$1,0 \times 10^{-1}$	$1,2 \times 10^{-6}$
-23,69	$1,0 \times 10^{-1}$	$1,5 \times 10^{-6}$
-23,64	$1,0 \times 10^{-1}$	$1,7 \times 10^{-6}$
-23,57	$1,0 \times 10^{-1}$	$2,0 \times 10^{-6}$
-23,27	$1,0 \times 10^{-1}$	$4,0 \times 10^{-6}$
-22,96	$1,0 \times 10^{-1}$	$8,0 \times 10^{-6}$
-22,17	$6,5 \times 10^{-2}$	$1,0 \times 10^{-5}$

3.3. Recolha e tratamento das amostras da água da Ria de Aveiro

Com vista a fazer o estudo da atividade do mercúrio em água do mar, foram recolhidas quatro amostras da Ria de Aveiro, de dois locais distintos, conforme ilustrado na Figura 6.

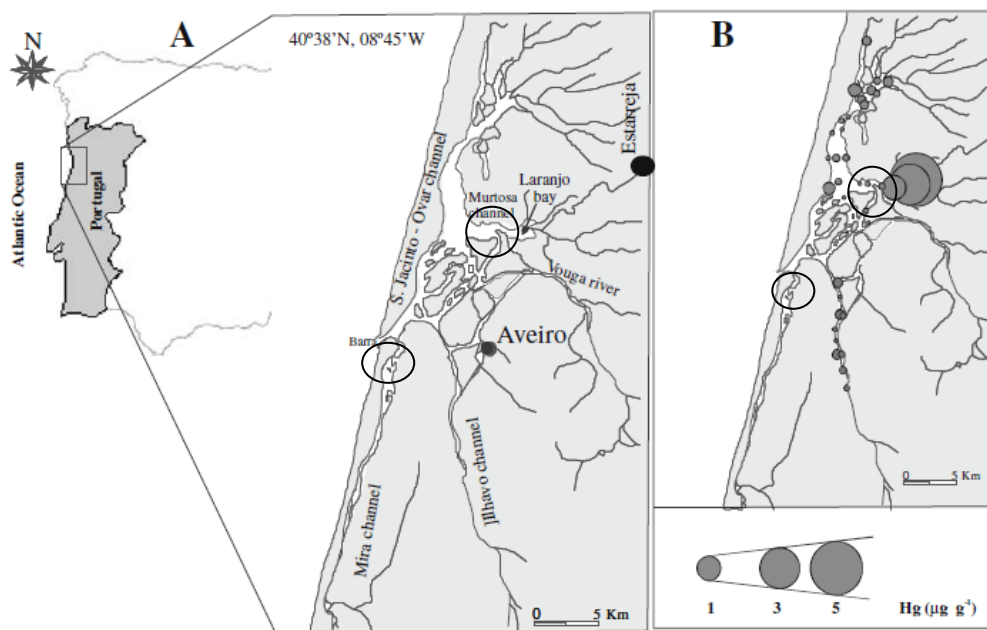


Figura 6: Mapa da zona de recolha das amostras da água da Ria de Aveiro.^[8]

Recolheram-se quatro amostras, duas junto à ponte da Barra, e outras duas na Baía de Estarreja. Utilizaram-se na recolha, em cada um dos locais, duas garrafas de PET de 500 mL previamente lavadas com ácido nítrico, 4 mol L^{-1} . A uma das amostras de cada local foram adicionados $350 \text{ }\mu\text{L}$ de ácido nítrico concentrado, de forma a baixar o pH, para um valor aproximadamente 2.

À chegada ao laboratório, todas as amostras foram filtradas por filtro de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$, para remover a matéria particular, visando eliminar possíveis interferências no sinal do eletrodo e quaisquer micro-organismos. As amostras foram guardadas no frigorífico.

Todo o material utilizado na filtração e na medição do potencial das amostras foi previamente lavado com ácido nítrico 4 mol L^{-1} , durante 1 dia, e seguidamente passado abundantemente por água Milli-Q, de forma a evitar contaminações.

3.4. Amostras da água da Ria de Aveiro da Barra com adição de mercúrio

À amostra da Barra da Ria de Aveiro, foi adicionado quantidades de mercúrio de forma a ter concentrações totais de mercúrio a variar entre $1,00 \times 10^{-7}$ e $5,63 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Na Tabela 8 encontram-se as atividades estimadas.

Tabela 8: Atividade do mercúrio adicionado à amostra da Ria de Aveiro da Barra.

$Hg(NO_3)_2$ (mol L ⁻¹)	$\log(a(Hg^{2+}))$
$1,0 \times 10^{-7}$	-22,30
$1,0 \times 10^{-5}$	-20,19
$1,0 \times 10^{-4}$	-19,30
$1,92 \times 10^{-4}$	-19,01
$2,82 \times 10^{-4}$	-18,85
$3,47 \times 10^{-4}$	-18,74
$5,53 \times 10^{-4}$	-18,55

Estas soluções foram usadas nos ensaios realizados com os sensores potenciométricos. A Tabela 9 mostra as atividades das amostras com adições de menores quantidades de mercúrio, que foram posteriormente analisadas por potenciometria e usadas nos ensaios biológicos.

Tabela 9: Atividade do mercúrio adicionado à amostra da Ria de Aveiro da Barra.

$Hg(NO_3)_2$ (mol L ⁻¹)	$\log(a(Hg^{2+}))$
$1,0 \times 10^{-9}$	-24,25
$1,0 \times 10^{-8}$	-23,25
$5,0 \times 10^{-8}$	-22,56
$1,0 \times 10^{-7}$	-22,25
$5,0 \times 10^{-7}$	-21,56
$1,0 \times 10^{-6}$	-21,25
$5,0 \times 10^{-6}$	-20,56
$1,0 \times 10^{-5}$	-20,25
$1,0 \times 10^{-4}$	-19,25

3.5. Medições com os sensores potenciométricos

As medições com os sensores potenciométricos foram realizadas numa célula eletroquímica: Ag|AgCl|KCl, 3 mol L⁻¹|Amostra|Sensor.

O voltímetro utilizado foi o dispositivo multicanal digital com impedância de entrada alta. Este é ligado ao computador, onde se encontra o programa Octopus, com vista em adquirir os valores dos sensores potenciométricos.

O sistema de sensores foi ligado aos correspondentes canais do voltímetro, e é constituído por 5 eléctrodos. Dois dos eléctrodos foram seletivos ao mercúrio, XC-Hg-001, com membranas de vidro calcogeneto e foram usados para a determinação da atividade do ião mercúrio, Hg^{2+} . Segundo o fabricante podem aplicar-se a concentrações a variar entre 10^{-6} e $10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ de Hg^{2+} , a temperaturas entre 5 e 80°C e para valores de pH entre 0 e 2, ajustados com HNO_3 .

O terceiro eléctrodo utilizado foi seletivo ao cloreto e é constituído por uma membrana policristalina de $\text{AgCl}|\text{Ag}_2\text{S}$ e foi usado na determinação da concentração do sal existente nas diferentes amostras, ou seja, da concentração do ião cloreto, Cl^- .

Ambos os eléctrodos seletivos para mercúrio e cloreto, foram adquiridos no Sensor System Ltd, Saint Petersburg.

O quarto eléctrodo utilizado é sensível ao pH e é constituído por uma membrana de vidro. O quinto eléctrodo é de referência, com prata/cloreto de prata como solução de enchimento interno de $\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$. Ambos os eléctrodos, de pH e de referência, são da Metrohm.

Antes de qualquer medição a realizar, todos os eléctrodos foram lavados com água Milli-Q, durante 30 minutos ou até o potencial estabilizar. Colocou-se cerca de 20 ml da solução a analisar num copo, mergulhou-se os eléctrodos, e espera-se até que o potencial estabilize. Registou-se então os valores. Cada leitura demorou aproximadamente 30 minutos.

Esporadicamente foi necessário polir a membrana dos eléctrodos de mercúrio com o papel abrasivo, seguida de lavagem com etanol e água Milli-Q.

3.6. Avaliação da toxicidade do mercúrio usando a bactéria *V. fischeri*

3.6.1. Metodologia e preparação do meio, inoculação e repicagem da bactéria

Os ensaios foram realizados com a bactéria *V. fischeri*, que se encontrava congelada a -80°C . Depois de descongelada, a bactéria foi colocada a crescer em meio. Para tal é necessário preparar previamente o meio de cultura sólido, *Meio Boss*, que é constituído por

6g de NaCl, 2g de peptona, 0,6g de extrato de carne, 3g de agar e 200 µl de glicerol, para cada 200 ml de água destilada, com um pH de $7,3 \pm 0,2$.

Após preparado o meio, foi necessário esterilizá-lo no autoclave, a uma temperatura de 121°C e pressão de 1 atm. Seguidamente, na hote, encheu-se meia caixa de petri com este meio, e deixou-se solidificar, sempre o mais isolado possível de possíveis contaminações. Após a solidificação do meio, mergulhou-se uma ansa no congelado e fez-se a raspagem no meio sólido e deixa-se crescer a bactéria á temperatura de 28°C, obtendo-se um crescimento semelhante ao da Figura 7.



Figura 7: Colónias de bactéria *V. fischeri* em placa.

Após o crescimento da bactéria em placa, foi necessário inocular e repicar a mesma. Para tal foi necessário um meio de cultura líquido que favoreça o crescimento da bactéria. Este meio Boss é igual ao descrito anteriormente, à exceção do agar, que para estes ensaios não é necessário, pois trata-se de um meio líquido.

O primeiro passo é a inoculação da bactéria, que consiste em coloca-la a crescer no meio de cultura previamente preparado. Para tal, retira-se uma colónia de bactéria, que se encontra crescida em placa, com o auxílio de uma ansa esterilizada, e dissolve-se no meio. Passa-se a entrada do recipiente pela chama, para evitar a entrada de contaminantes, e fecha-se. Todo este processo é realizado na hote e com uma lamparina acesa, de forma a ter um ambiente o mais esterilizado possível.

Depois da bactéria se encontrar já no meio, coloca-se na estufa a 28°C, com uma agitação de 120 rpm e deixa-se crescer durante 16h, cultura *overnight*.

Após o tempo de crescimento da bactéria, fez-se a repicagem da mesma, com vista a obter uma densidade ótica de 10^8 células por mL. Retira-se 240 μ L da preparação anterior e coloca-se num novo recipiente com 30mL de meio Boss, esterilizado. De seguida, procede-se da mesma forma que na inoculação, em relação às condições de crescimento. Após a repicagem a bactéria ficou pronta a ser usada para os ensaios de luminescência.

Todo o material usado nestes ensaios foram autoclavados, bem como a água do mar artificial. A água da Ria de Aveiro foi filtrada com filtro de 0,22 μ m para eliminar as bactérias existentes.

3.6.2. Calibração: luz emitida vs número de colónias

A emissão de luz da bactéria *V. fischeri* é diretamente proporcional á atividade metabólica. Sendo assim, foi possível quantificá-la através da relação entre a unidade formadoras de colónias, CFU, e a luz emitida. Este estudo foi realizado em por dois passos: leitura da luz emitida e semeio da bactéria, para posterior contagem do número de colónias.

Numa primeira fase, em cuvete, colocou-se 450 μ l de água do mar artificial previamente autoclavada, ao qual se adicionou 50 μ l de suspensão de bactéria, de forma a ter uma diluição aproximadamente de 1:10. Desta retiraram-se 300 μ l para uma cuvete e leu-se a emissão de luz, sendo esta a solução com uma diluição de 10^{-1} , em relação á bactéria.

A leitura da emissão de luz foi feita no luminómetro TD-20/20 (Turner Designs, Inc., USA), onde foi inserida a cuvete num orifício do luminómetro, que está isolado da luz exterior. O luminómetro usado encontra-se na Figura 8



Figura 8: Luminómetro usado na medição da luz emitida pela bactéria.

O luminómetro tem uma capacidade máxima de leitura de 9999 de luminescência. Caso o valor seja superior, é necessário fazer uma diluição de 1:10 para que a leitura seja possível, tendo-se sempre em conta o fator de diluição no tratamento de dados.

Numa nova cuvete com 450 μL de água do mar artificial, adicionou-se 50 μL da solução medida anteriormente, e procedeu-se da mesma forma para a leitura, obtendo-se assim a solução de diluição 10^{-2} . As leituras sucessivas foram realizadas da mesma forma, até se obter uma diluição de 10^{-7} .

Numa segunda fase, para o semeio da bactéria, preparou-se *Meio Boss*, ao qual foi adicionado agar, de forma a ter um meio sólido para o crescimento das colónias, e esteriliza-se. Em caixas de petri esterilizadas juntou-se ± 15 mL do meio e deixou-se solidificar.

Para o semeio propriamente dito, em sete tubos de ensaio, previamente autoclavados, colocou-se 9 mL de água do mar artificial esterilizada e posteriormente, adicionou-se 1 mL de suspensão mãe no primeiro. Para o segundo adicionou-se 1 mL da solução do tubo anterior, e assim sucessivamente até se ter uma diluição de 10^{-6} .

De cada tubo, retirou-se 100 μL da amostra contendo bactéria e colocou-se na caixa de petri, que contem o meio sólido, e espalhou-se uniformemente. Por fim, colocou-se na estufa a 28°C , até que o crescimento seja notório e contável, cerca de 1 dia. Após esse tempo, contou-se o número de colónias existentes em cada caixa de petri.

3.6.3. Medições da luminescência com a bactéria *V. fischeri*

Para a realização deste ensaio, a cada 9 mL de amostra foram adicionados 1mL de bactéria, que se encontra no seu meio de cultura. Além das amostras mencionados anteriormente, nas Tabela 6 e Tabela 8, foram também realizados ensaios com dois controlos, um só com água do mar artificial e um outro com água do mar artificial e NaBr com concentração de $0,11 \text{ mol L}^{-1}$.

As leituras da emissão de luz da bactéria foram realizadas para os tempos de 0 e 10 minutos. A partir deste último, mediu-se de 15 em 15 minutos até o tempo de 130 minutos. Para cada medição, retirou-se 300 μL de amostra, sempre com uma lamparina acesa na área de trabalho, colocou-se numa cuvete e mediu-se a luz emitida.

4. Análise e Discussão de Resultados

4.1. Calibração dos elétrodos seletivos aos iões

4.1.1. Calibração dos elétrodos seletivos ao mercúrio

As medições foram realizadas de acordo com o procedimento descrito na secção Materiais e Métodos e foram usados 2 elétrodos seletivos ao mercúrio com as membranas de vidro calcogeneto. Os elétrodos eram idênticos, exceto, pelo o tempo de uso, ou seja, um era novo, Hg1, e o outro possuía 3 anos, Hg2. A calibração dos dois elétrodos foi feita a fim de avaliar o efeito do envelhecimento nas características dos sensores.

Inicialmente, as medições foram efetuadas numa gama de concentrações de mercúrio típicas de resposta, a variar entre $6,31 \times 10^{-8}$ e $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, e em condições recomendadas pelo fabricante dos ISE, isto é, com o pH igual a 2, ajustado com o ácido nítrico.

Nestas condições, a atividade de mercúrio é semelhante à concentração, pois no meio envolvente não existem iões para complexar com o mercúrio, além do ião hidróxido que está numa concentração baixa, visto o pH ser 2. No entanto, calcularam-se as atividades de cada solução, tendo em consideração a possível formação de complexos com o ião hidróxido. Na Figura 9 mostra-se o potencial em função do logaritmo da atividade do mercúrio livre.

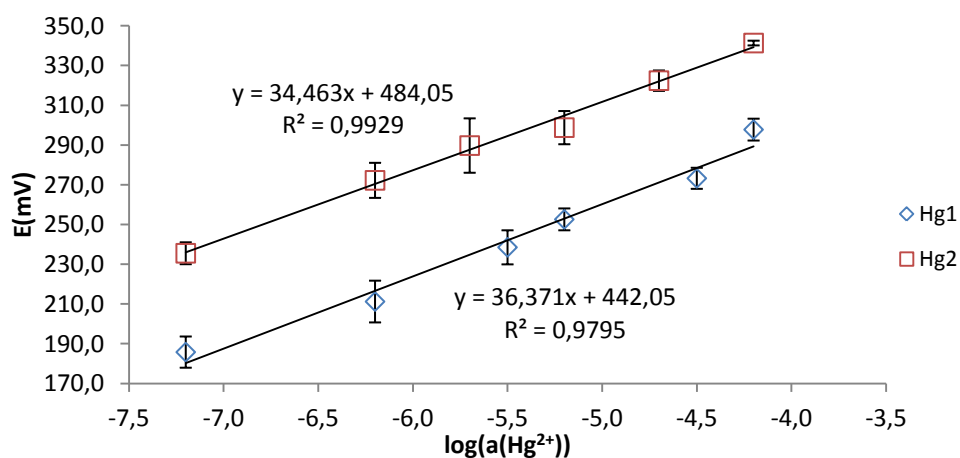


Figura 9: Reta de calibração para atividades de mercúrio livre.

Os potenciais obtidos com o eletrodo Hg2 apresentam valores mais elevados apesar da tendência da resposta com o logaritmo da atividade de mercúrio ser semelhante ao eletrodo Hg1.

O declive da reta obtido para ambos os sensores é positivo, pois o ião em causa apresenta uma carga positiva e está de acordo com o esperado. Segundo as recomendações do fabricante, o declive seria de 30 ± 10 mV/pHg.

Para o eletrodo Hg1 obteve-se um declive de 36 ± 2 mV/pHg e um potencial padrão de 442 ± 38 . Em relação ao segundo eletrodo, Hg2, obteve-se um declive de 34 ± 2 mV/pHg e o potencial padrão foi de 484 ± 28 .

O eletrodo Hg1 apresenta uma maior sensibilidade, pois o seu declive é maior. No entanto, tendo em conta o desvio padrão do declive de ambos os eletrodos, não se pode considerar que o Hg1 é mais sensível que o Hg2.

4.1.2. Calibração dos eletrodo de pH e seletivo a cloreto

O controlo de pH em todos os ensaios é essencial, pois a atividade do mercúrio livre, o comportamento dos eletrodos seletivos ao mercúrio e a viabilidade da bactéria *V. fischeri* dependem do pH. Com vista a controlar o pH, realizou-se uma calibração do eletrodo. A resposta do eletrodo de pH nas soluções tampão é apresentada na Figura 10.

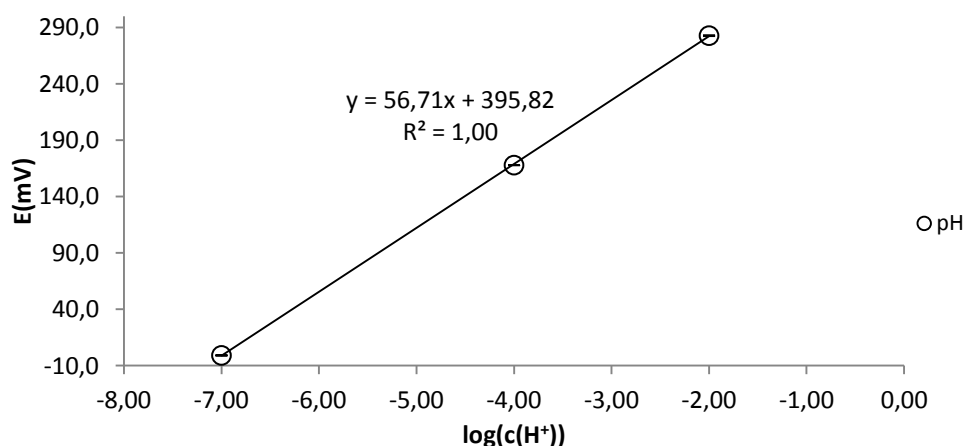


Figura 10: Calibração do eletrodo de pH.

Obteve-se uma relação linear entre potencial e o pH, com um declive de 56,71 mV/pH que está de acordo com o teórico 59,10, segundo a equação de Nernst. Este

declive deve-se ao facto de o ião ter carga +1, o que se transmite num declive positivo. O potencial padrão foi de 395,82.

De forma a quantificar a concentração do cloreto nas amostras efetuou-se uma calibração do eletrodo. A concentração do cloreto é um fator importante, pois o comportamento da bactéria é afetado pela salinidade do meio. Além disto, a atividade do mercúrio é influenciada pela concentração de cloreto disponível, pois o mercúrio tende a complexar com este.

A resposta do eletrodo seletivo ao cloreto em soluções de cloreto de sódio é apresentada na Figura 11.

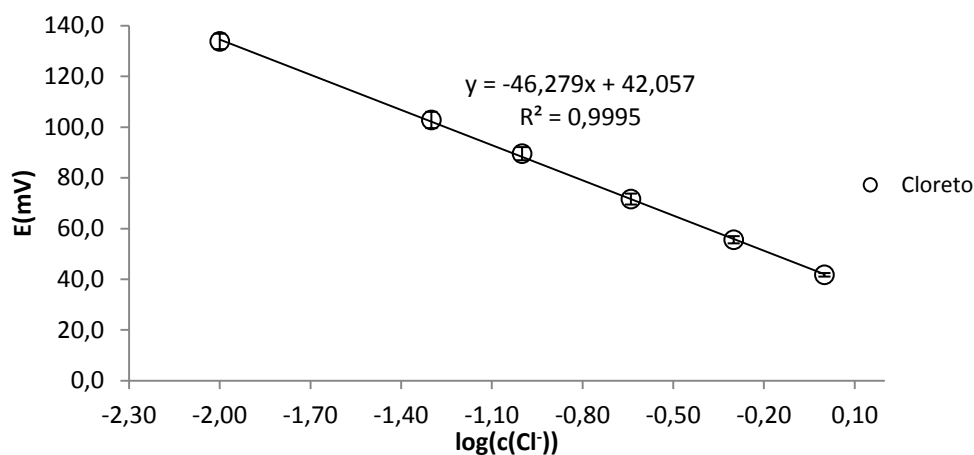


Figura 11: Resposta do eletrodo seletivo do cloreto nas soluções de cloreto de sódio.

Verifica-se que com o aumento da concentração do NaCl, o potencial tende a diminuir. Tal deve-se ao facto de o eletrodo responder ao cloreto e este ser um anião, o que resulta num declive negativo. O declive da reta de calibração foi de -46,28 mV/pCl, que se afasta do esperado de -59,10 e o seu potencial padrão foi de 42,06.

4.2. Efeito pH na atividade do mercúrio livre

É recomendado efetuar a determinação do mercúrio com os ISE com pH controlado e baixo, tipicamente 2, pois os eletrodos potenciométricos respondem aos iões livres de mercúrio e a especiação do mercúrio depende do pH, devido à formação de complexos com o ião hidróxido.

Na ausência de ligandos capazes de complexar com os iões de mercúrio em solução, a atividade vai depender fortemente do pH do meio. As formas de mercúrio para a concentração total de $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em função do pH, são apresentadas na Figura 12.

Neste caso, com o aumento do pH aumenta a concentração do ião OH^- , que tende a formar os complexos HgOH^+ e Hg(OH)_2 , que apresentam constantes de estabilidade de $2,51 \times 10^{-11}$ e $1,68 \times 10^{-22}$, respetivamente, para 25°C . Em consequência com o aumento do pH, aumenta a concentração dos complexos hidróxido de mercúrio concorrentemente com a diminuição da concentração dos iões Hg^{2+} .

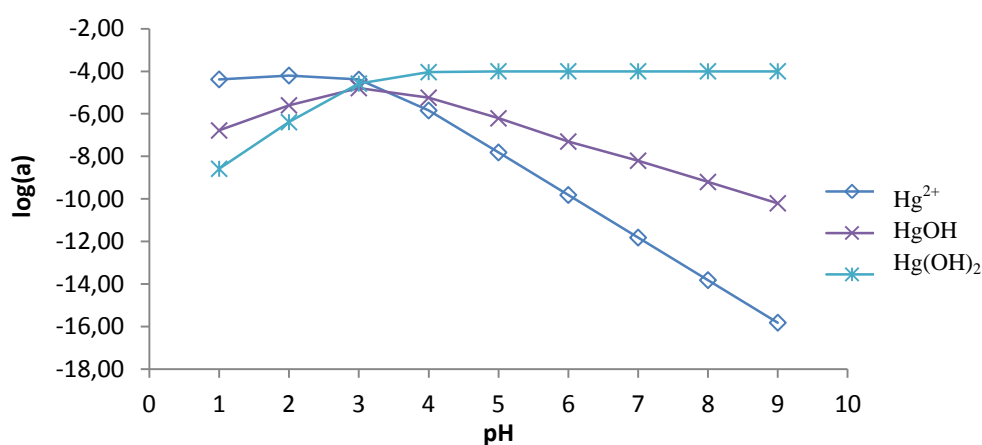


Figura 12: Efeito do pH na atividade do mercúrio livre para uma concentração total de $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Para valores de pH até 2,5 a quantidade de ião hidróxido é bastante baixa, o que faz com que a concentração dos complexos hidróxido de mercúrio seja significativamente mais baixa que a de mercúrio livre. Para valores de pH superiores a 3, os complexos hidróxido de mercúrio tornam-se a forma dominante de mercúrio na solução, o que resulta num decréscimo da concentração do mercúrio livre.

A especiação do mercúrio, isto é, a atividade de Hg^{2+} e dos complexos dominantes, com a variação de pH, apresenta-se na Figura 13 e Figura 14. Esta especiação do mercúrio em função do pH foi efetuada na presença de ligandos capazes de complexar com o mesmo, como o cloreto e brometo, e referem-se às soluções da Tabela 6 da secção Materiais e Métodos.

Análise e discussão de resultados

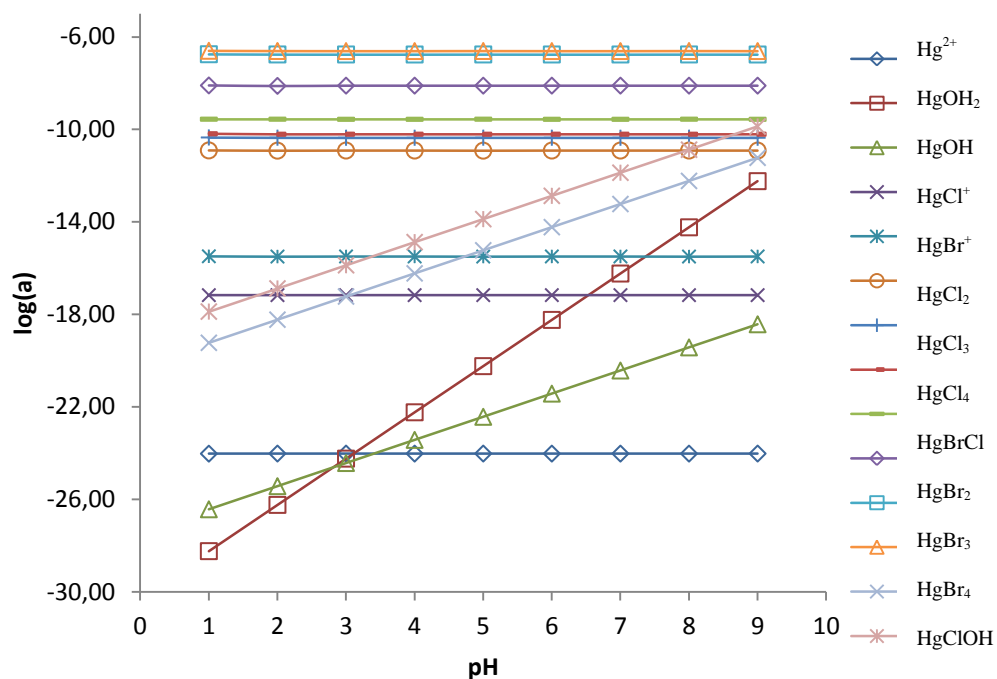


Figura 13: Efeito do pH na concentração do mercúrio livre, Hg^{2+} , para a concentração total de mercúrio de $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, na presença de $0,11 \text{ mol L}^{-1}$ de brometo e $0,48 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto.

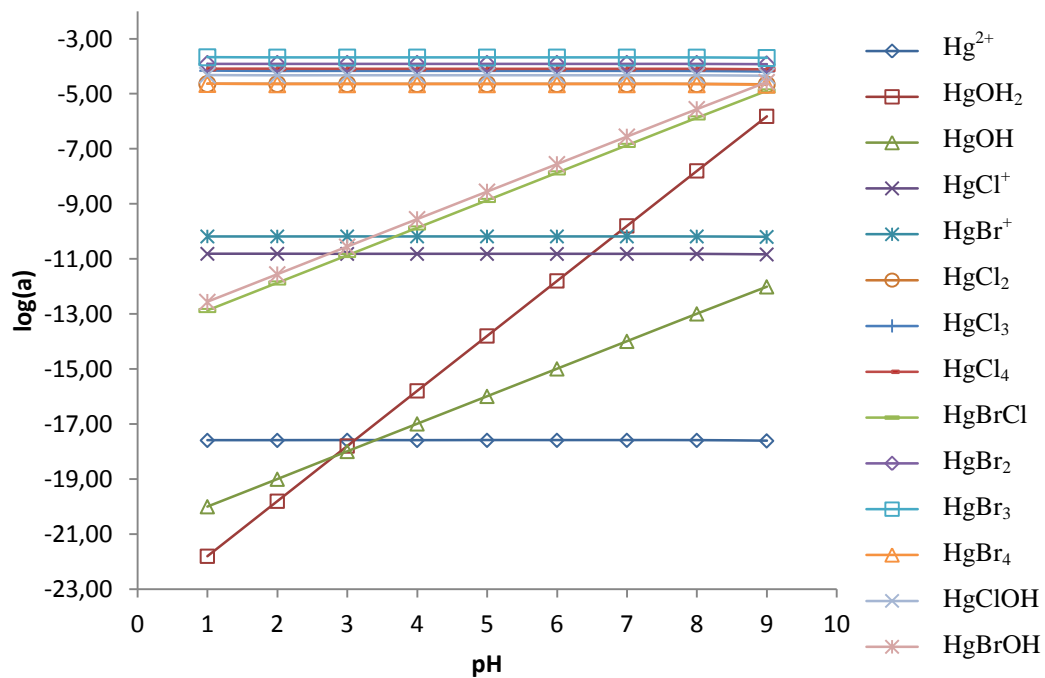


Figura 14: Efeito do pH na concentração do mercúrio livre, Hg^{2+} , para a concentração total de mercúrio de $9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, na presença de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de brometo e $0,48 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto.

Na presença de ligandos capazes de formar complexos com o mercúrio, como por exemplo os aniões presentes em água do mar, cloreto e brometo, não se verifica a variação de concentração de Hg^{2+} com a mudança do pH. Tal acontece devido ao facto das concentrações de cloreto e brometo serem mais elevadas que a do OH^- , e de as constantes de estabilidade dos complexos do mercúrio com o cloreto e o brometo serem maiores, comparadas com a do hidróxido. Por exemplo, as constantes de estabilidade dos complexos HgOH^+ e Hg(OH)_2 são $2,51 \times 10^{-11}$ e $1,58 \times 10^{-22}$, respetivamente, dos complexos com cloreto HgCl_2 , HgCl_3^- e HgCl_4^{2-} são $6,46 \times 10^{-21}$, $6,46 \times 10^{-22}$ e $1,62 \times 10^{-22}$, respetivamente, e dos complexos com brometo HgBr_2 , HgBr_3^- e HgBr_4^{2-} são $5,37 \times 10^{-25}$, $2,00 \times 10^{-27}$ e $1,17 \times 10^{-28}$, respetivamente.

A combinação destes fatores leva a que a maior parte do mercúrio neste sistema se encontre complexado com o cloreto e o brometo, resultando numa concentração de Hg^{2+} muito baixa. Embora com aumento do pH a concentração dos complexos de mercúrio com hidróxido também aumente, bem como a dos complexos mistos com cloreto e hidróxido, a concentração destes complexos é bastante baixa e não altera a concentração de iões de Hg.

Este é um resultado importante, pois os ensaios com a bactéria têm de ser realizados em soluções com valores de pH na gama de $7,3 \pm 0,2$, enquanto que para os ensaios a realizar com os sensores seletivos ao mercúrio é recomendado pH 2, principalmente para assegurar que Hg esteja na forma de Hg^{2+} . Outra razão para efetuar medições com os elétrodos seletivos ao mercúrio a pH ácido, pode ser a influência deste no mecanismo de resposta.

A fim de avaliar o efeito do pH no comportamento do elétrodo, apresentar-se-ão as medições com os elétrodos nas soluções tampão salinas de mercúrio com pH diferentes. A ausência do efeito do pH no comportamento dos elétrodos permitira realizar os ensaios biológicos e medições com elétrodos nas mesmas amostras com pH 7, facilitando interpretação e comparação dos resultados destas duas técnicas.

4.3. Calibrações com os elétrodos seletivos em soluções tampão de mercúrio a pH 2 e pH 7

Para calibrar os elétrodos numa gama de atividade baixa de mercúrio, foram usados as soluções tampão salinas de concentração e pH conhecidos. Esta abordagem baseia-se no

uso da concentração total elevada de metal, neste caso o mercúrio, e na presença dos ligandos capazes de formar complexos estáveis com este metal, o que permite a preparação de maneira reproduzível de soluções com atividade baixa do metal.

Na Tabela 5 da secção Materiais e Métodos, encontram-se as composições das soluções medidas e respetivos logaritmos da atividade de mercúrio. Para obter atividades baixas, adicionaram-se às soluções de mercúrio cloreto de sódio e brometo de sódio, de forma a complexar o mercúrio com estes aniões, ficando assim com concentrações baixa de Hg livre. Para as amostras com atividades superiores a $1,48 \times 10^{-19}$ mol L⁻¹ foi adicionado nitrato de potássio, com vista a manter constante a força iónica.

Foi efetuada uma reta de calibração para valores de atividade a variar entre $1,82 \times 10^{-24}$ e $2,51 \times 10^{-12}$ mol L⁻¹. Estes ensaios foram realizados a diferentes valores de pH: 2 e 7. De seguida, na Figura 15, apresentam-se os resultados obtidos para pH igual a 2.

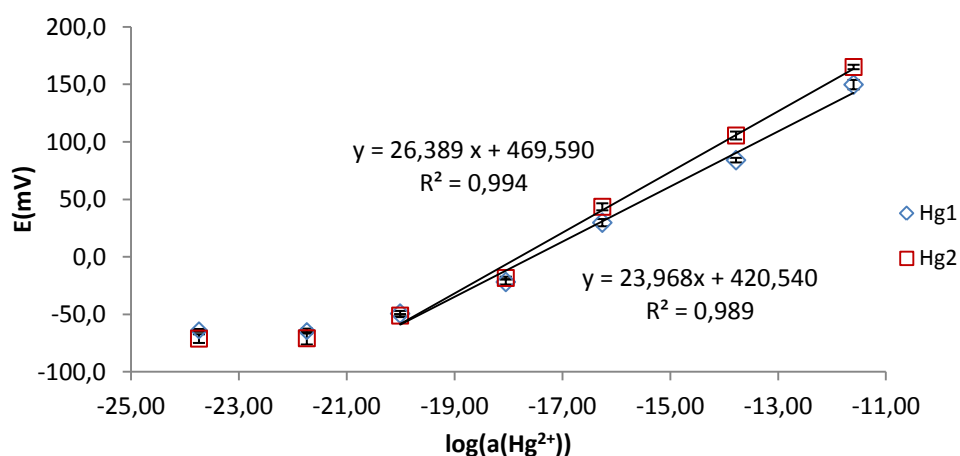


Figura 15: Reta de Calibração para as soluções tampão com pH igual a 2.

Nesta calibração, e para ambos os eléctrodos, obteve-se um declive que se pode considerar semelhante com o valor teórico. O valor esperado seria de 29,55 pois é um ião com carga +2. Para o eléctrodo Hg1 obteve-se um declive de 24 ± 1 mV/pHg e um potencial padrão de 421 ± 53 . Em relação ao segundo eléctrodo, Hg2, o declive obtido foi de 26 ± 1 mV/pHg e o potencial padrão de 470 ± 45 . Daqui resulta uma maior sensibilidade por parte do eléctrodo Hg2, pois tem um declive superior. Para o eléctrodo Hg1 obteve-se um limite de detecção de $2,04 \times 10^{-21}$ mol L⁻¹ e para Hg2 de $1,95 \times 10^{-21}$ mol L⁻¹.

De seguida, para estudar o efeito do pH no funcionamento dos sensores, realizou-se o mesmo ensaio, mas desta vez com pH 7. Na Figura 16 encontram-se os resultados obtidos para pH igual a 7.

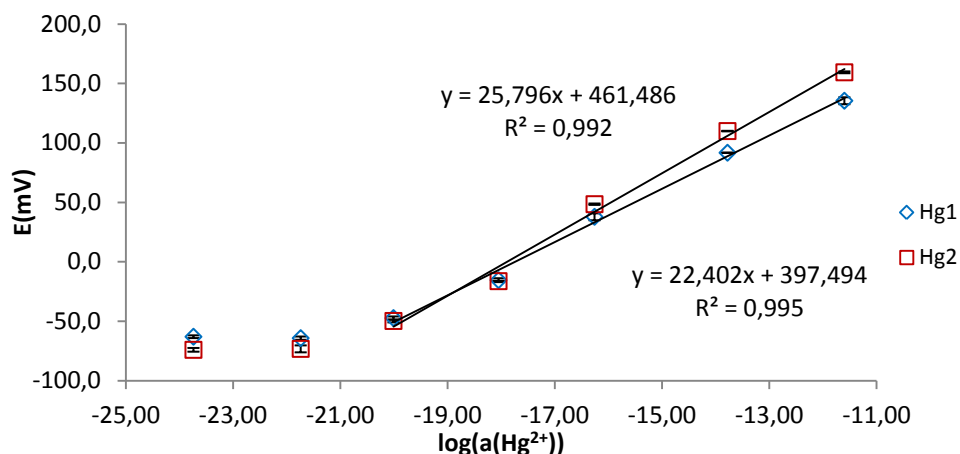


Figura 16: Reta de Calibração para as amostras tampão com pH igual a 7.

Para ambos os elétrodos obteve-se declives de $22,4 \pm 0,2 \text{ mV/pHg}$ e $25,8 \pm 0,5 \text{ mV/pHg}$ para o eletrodo Hg1 e Hg2, respetivamente. Em relação ao potencial padrão o resultado obtido foi de 397 ± 6 , para Hg1, e de 461 ± 18 , para Hg2. Novamente verifica-se maior sensibilidade por parte do eletrodo Hg2. Em ambos os elétrodos o LOD foi semelhante, $9,77 \times 10^{-22} \text{ mol L}^{-1}$ e $7,76 \times 10^{-22} \text{ mol L}^{-1}$ para os sensores Hg1 e Hg2, respetivamente.

Comparando os resultados obtidos para as soluções com os diferentes valores de pH, verifica-se que com o aumento do pH o limite de deteção é superior, pois para pH 7 o sensor é capaz de detetar atividades mais baixas. No entanto, os declives são semelhantes, e em ambos os casos o eletrodo Hg2 tem maior sensibilidade.

De seguida para melhor perceber a gama de linearidade da reta de calibração para o mercúrio livre, juntou-se no mesmo gráfico os dados de baixa e alta atividade, pois para valores intermédios não era possível obter as soluções, Figura 17

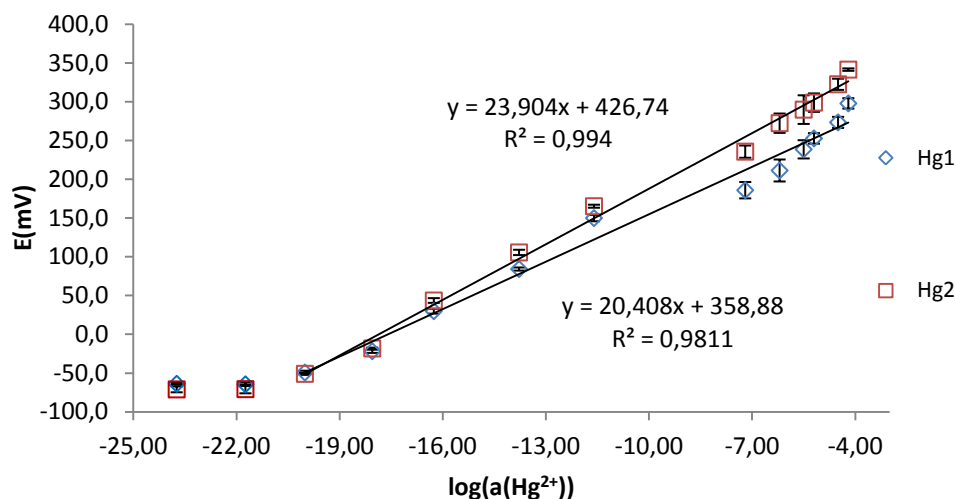


Figura 17: Gama de linearidade para o mercúrio livre.

Com a junção dos dados das amostras de alta e baixa atividade, é possível verificar que o sensor tem uma gama de linearidade elevada, verificando-se assim, que é possível aplicar o sensor para gamas de atividade a variar, em média, entre $2,00 \times 10^{-21}$ e $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

Como se pode ver pelos resultados, para valores da atividade de Hg^{2+} elevados, a variar entre $6,31 \times 10^{-8}$ e $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, o declive é bastante superior em comparação com as soluções de atividade baixa. Com o diminuir da atividade, o declive tende também a diminuir.

A diminuição do declive do eletrodo com a membrana de vidro calcogeneto seletiva ao mercúrio, com diminuição de concentração de iões de mercúrio é conhecida de estudos feitos anteriormente. A não linearidade da resposta do sensor seletivo ao mercúrio está relacionada com o mecanismo de resposta potenciométrico misto, que envolve mais de que um processo de geração de potencial.^[42]

4.4. Calibrações com os eletrodos seletivos ao mercúrio em água do mar artificial.

De forma a compreender o comportamento dos eletrodos na água do mar, que pode ser diferente devido a presença de outros elementos além de cloreto, estudou-se o comportamento do mercúrio livre na água do mar artificial.

Prepararam-se soluções com a composição descrita na Tabela 6 da secção Materiais e Métodos, que se analisaram com os dois elétrodos. Na Figura 18 apresentam-se as respostas dos elétrodos em contato com aquelas soluções.

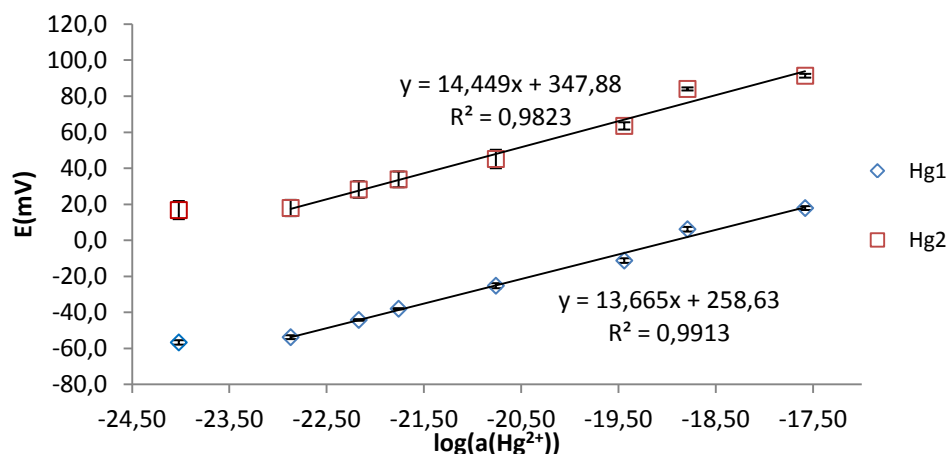


Figura 18: Calibração em água do mar artificial.

Para o primeiro elétrodo, Hg1, o declive obtido foi de $13,7 \pm 0,6$ mV/pHg, o potencial padrão de 259 ± 31 e o LOD de $2,14 \times 10^{-24}$ mol L⁻¹. Em relação ao segundo elétrodo, Hg2, o declive teórico obtido foi de $14,5 \pm 0,9$ mV/pHg, o potencial padrão de 348 ± 47 e o LOD de $3,16 \times 10^{-24}$ mol L⁻¹. Comparando a resposta dos dois elétrodos verifica-se que o elétrodo Hg2 tem maior sensibilidade, pois o seu declive é maior, no entanto, tem um LOD semelhante ao Hg1.

Estes ensaios não foram necessários realizar a diferentes valores de pH, pois constatou-se teoricamente segundo o programa MINTEQA, que o pH não interfere na atividade do mercúrio livre.

4.5. Estabilidade ao longo do tempo das características dos sensores em contacto com soluções padrão salinas

De forma a estudar a estabilidade das características dos sensores, foram comparados resultados realizados ao longo da realização deste trabalho.

Comparando os resultados obtidos ao longo do trabalho experimental, verifica-se que ambos os sensores perderam ligeiramente a sua sensibilidade, visto o declive tender a diminuir ao longo do desenvolvimento do trabalho. Além disto, verifica-se que a diferença

de sinal entre os dois sensores tende a ser maior, visto o elétrico Hg2 ter potenciais maiores em relação ao Hg1 e em relação aos ensaios realizados no início do ano.

4.6. Curva de calibração CUF vs luminescência

Para confirmação da relação entre intensidade da luz emitida e a população de bactérias *V. fischeri*, foi medida a luz emitida para as amostras com o número de unidades formadoras de colónias diferentes. O resultado obtido encontra-se na Figura 19.

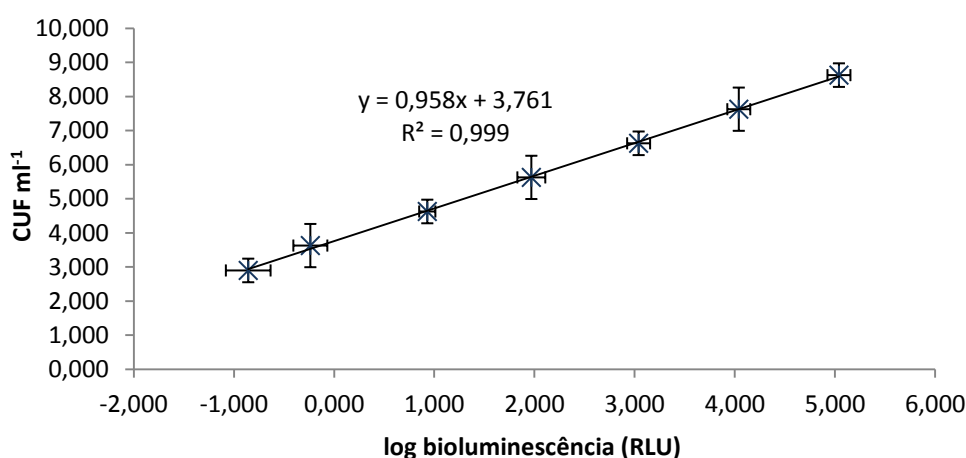


Figura 19: Reta de calibração para a unidade formadora de colónias vs emissão de luz.

O resultado obtido demonstra uma relação linear entre o número de unidades formadoras de colónias e a luz emitida. Com isto, observa-se que á medida que a luz aumenta o mesmo se verifica com o número de colónias e vice-versa. Isto indica que a luz emitida pelas bactérias pode ser usada para estimação da viabilidade das mesmas e em consequência, para a avaliação da toxicidade do meio para a bactéria *V. fischeri*.

4.7. Estudo da toxicidade do mercúrio na água do mar artificial

Para avaliar a toxicidade do mercúrio adicionado à água do mar artificial foram feitos ensaios com a bactéria *V. fischeri*. As composições das soluções da água do mar e a respetiva atividade de mercúrio foram apresentadas na Tabela 7 da secção Materiais e Métodos.

A gama de atividades de mercúrio para o ensaio biológico foi escolhida com base nos dados publicados para a toxicidade aguda e crônica do mercúrio em água do mar. Para as concentrações totais de mercúrio correspondentes, e partindo das composições da água do mar artificial, calcularam-se as atividades de mercúrio livre, tendo-se chegado aos valores de $6,76 \times 10^{-23}$ mol L⁻¹ para a toxicidade aguda e de $9,55 \times 10^{-25}$ mol L⁻¹ para a toxicidade crônica.

As quantidades de mercúrio e de brometo na água do mar artificial foram ajustados para obter atividades de mercúrio livre dentro dos limites de toxicidade crônica e aguda. Estas soluções foram usadas para a medições com a bactéria *V. fischeri*. Foram usados como controlo a água do mar artificial sem nenhuma adição, e para testar a influência do brometo foi também analisada outra com adição de brometo. A intensidade da luz emitida em função do tempo, para as diferentes atividades de mercúrio, encontra-se na Figura 20.

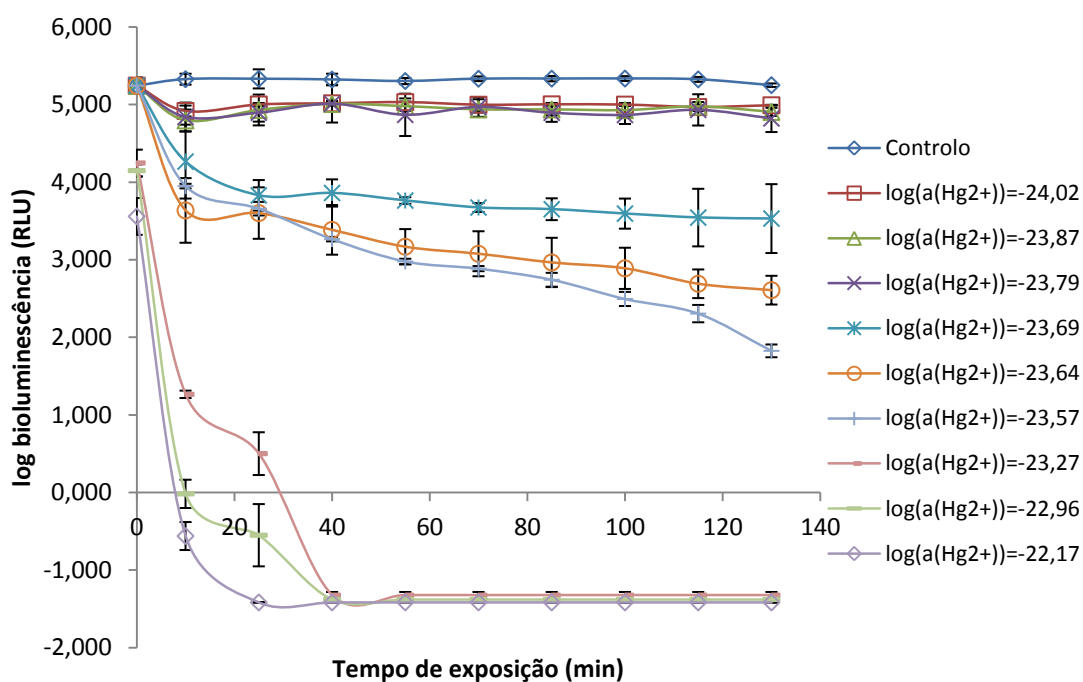


Figura 20: Efeito do mercúrio na emissão de luz da bactéria *V. fischeri*.

Comparativamente ao controlo, a luminescência de todas as amostras está abaixo desta, ou seja, têm uma emissão de luz inferior, que indica que o mercúrio é um inibidor de luz.

As três primeiras amostras, com as atividades mais baixas de $9,5 \times 10^{-25}$, $1,35 \times 10^{-24}$ e $1,62 \times 10^{-24} \text{ mol L}^{-1}$, apesar de terem uma emissão de luz inferior ao controlo, esta emissão é constante ao longo do tempo com um valor que não é muito inferior à do controlo. Este ligeiro decréscimo na luminescência mostra que o mercúrio tem um impacto no comportamento da bactéria mas que o mesmo não é muito importante e que essa diminuição na luz emitida não se acentua ao longo do tempo do ensaio.

Os ensaios com atividades de mercúrio de $2,04 \times 10^{-24}$, $2,29 \times 10^{-24}$ e $2,69 \times 10^{-24} \text{ mol L}^{-1}$ têm uma diminuição significativa na emissão de luz ao longo do tempo, sendo maior para o último. As curvas de resposta para estas atividades têm uma taxa de decréscimo praticamente constante, que depende da atividade. É de salientar que a forma das curvas de resposta ao longo do tempo são típica para efeitos tóxicos resultantes dos metais de transição.

Os três últimos ensaios, com as atividades mais elevadas de $6,76 \times 10^{-24}$, $1,10 \times 10^{-23}$ e $6,76 \times 10^{-23} \text{ mol L}^{-1}$, têm um efeito imediato na emissão de luz da bactéria. Para $t=0$ o efeito já é significativo, pois comparativamente ao controlo, e mesmo às outras amostras, a emissão de luz é bastante inferior. Para o ensaio com a atividade de $6,76 \times 10^{-24} \text{ mol L}^{-1}$ já não há emissão de luz ao fim de 25 minutos, enquanto que para as amostras com maior atividade já não há emissão de luz ao fim de 10 minutos. Verifica-se que para atividade de mercúrio superiores a $6,76 \times 10^{-24} \text{ mol L}^{-1}$ o efeito, além de ser imediato, é totalmente tóxico para a bactéria.

A Otimização do tempo ótimo de exposição da bactéria à água do mar artificial com as diferentes concentrações de mercúrio, foi obtida com base na inibição da emissão de luz da bactéria *V. fischeri*. A inibição é calculada segundo a equação (12):^[23]

$$INH\% = 100 - \left(\frac{IT_T \times IC_o}{IT_o \times IC_T} \right) \times 100 \quad (12)$$

em que $INH\%$ é a inibição em percentagem, IT_T e IC_T são a luminescência para a amostra e controlo, respetivamente, para $t= T$ minutos, e por fim, IT_o e IC_o são a luminescência para a amostra e controlo, respetivamente, para $t=0$ minutos.

Os resultados obtidos para a inibição da emissão de luz ao longo do tempo experimental para as diferentes atividade, encontram-se na Figura 21.

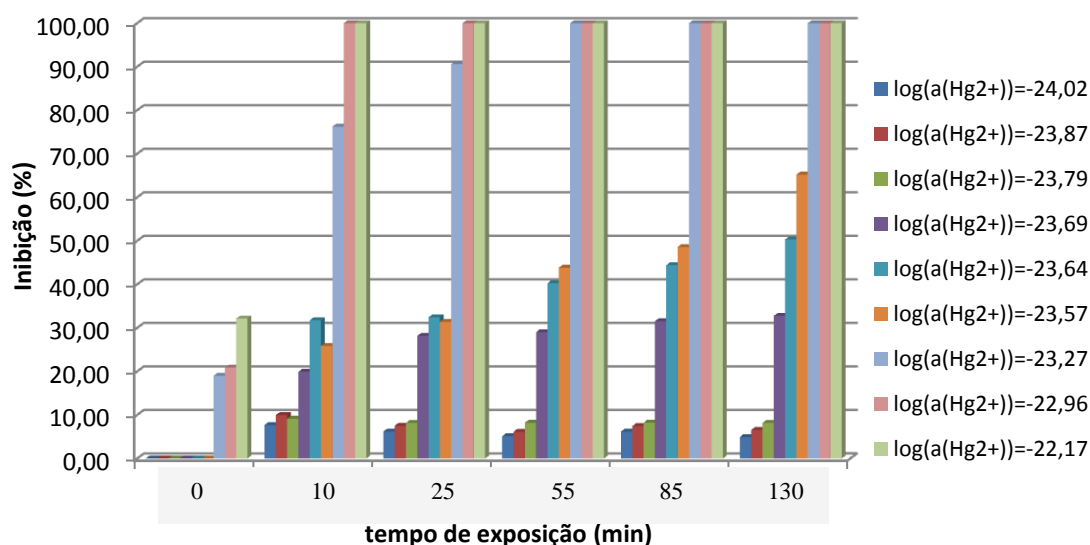


Figura 21: Inibição para cada solução para os tempos 0, 10, 25, 55,85 e 130 minutos.

Como se pode ver, o impacto por parte do mercúrio aumenta com o aumento da atividade do mercúrio livre e tende a ser mais intenso ao longo do tempo, exceto nas três primeiras soluções, em que a atividade varia entre $9,55 \times 10^{-25}$ e $1,62 \times 10^{-24} \text{ mol L}^{-1}$, que têm uma inibição inicial e mantem constante ao longo ao tempo. Para o último tempo, de 130 minutos, a atividade de $9,55 \times 10^{-25} \text{ mol L}^{-1}$ provoca uma inibição de 4,94%, a atividade de $1,35 \times 10^{-24} \text{ mol L}^{-1}$ uma inibição de 6,56% e a atividade de $1,62 \times 10^{-24} \text{ mol L}^{-1}$ uma inibição de 8,17%, em relação ao controlo.

Para as amostras com atividades a variar entre $5,37 \times 10^{-24}$ e $6,76 \times 10^{-23} \text{ mol L}^{-1}$ a inibição quase que é imediata, pois ao fim de 10 minutos esta já é superior a 70%. Os restantes ensaios, com atividade intermédias de $2,04 \times 10^{-24}$ e $6,69 \times 10^{-24} \text{ mol L}^{-1}$, a inibição tem um efeito gradual, que tende a aumentar ao longo do tempo.

Verifica-se que o tempo ótimo para a realização do ensaio da toxicidade do mercúrio para a bactéria *V. fischeri* é de 10 e 25 minutos. Esta conclusão deve-se ao facto de se obter um comportamento ótimo entre a atividade de mercúrio livre e a inibição da luminescência, em que com o aumento da atividade a inibição aumenta de forma proporcional. O resultado pode ser observado na Figura 22.

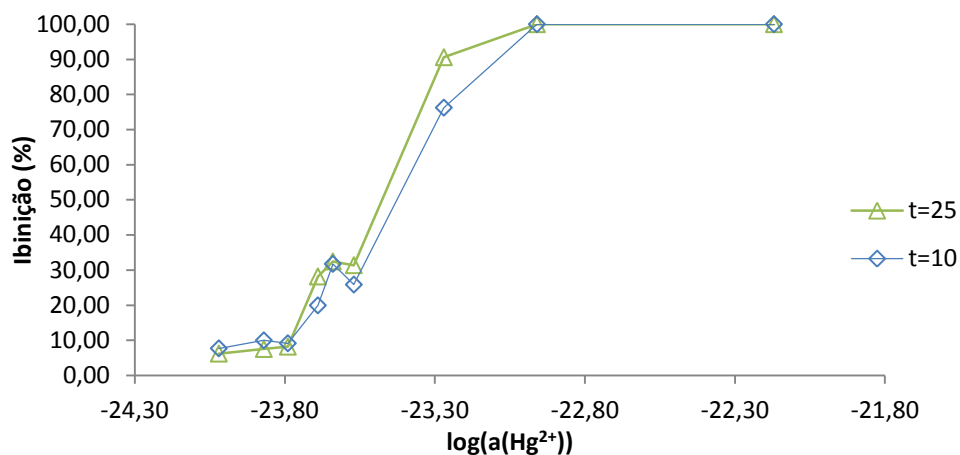


Figura 22: Inibição da luz emitida pela bactéria *V. fischeri* em função da atividade de mercúrio na água do mar artificial, para $t = 10$ e $t = 25$.

Para estes tempos podem distinguir-se 3 zonas distintas. A primeira zona está localizada entre $9,55 \times 10^{-25}$ e $1,62 \times 10^{-24} \text{ mol L}^{-1}$, em que mercúrio tem um impacto quase nulo na emissão da luz da bactéria *V. Fischeri*. A segunda zona é a que corresponde à zona para o qual emissão de luz diminui de forma gradual com o aumento da atividade, e está compreendida entre $1,62 \times 10^{-24}$ e $5,37 \times 10^{-24} \text{ mol L}^{-1}$. Por fim, a última zona corresponde às atividades para qual a inibição da emissão de luz é total, que se compreende entre $1,09 \times 10^{-23}$ e $6,76 \times 10^{-23} \text{ mol L}^{-1}$.

Deste resultado pode-se determinar a toxicidade aguda, que corresponde à atividade para a qual a inibição é de 50%. Para de $t=25$ a toxicidade aguda corresponde à atividade de $3,31 \times 10^{-24} \text{ mol L}^{-1}$ e para $t=10$ à atividade de $3,72 \times 10^{-24} \text{ mol L}^{-1}$.

Estas amostras foram também analisadas com os sensores potenciométricos. A resposta do sensor em conjunto com os resultados da inibição bacteriológica é apresentada na Figura 23.

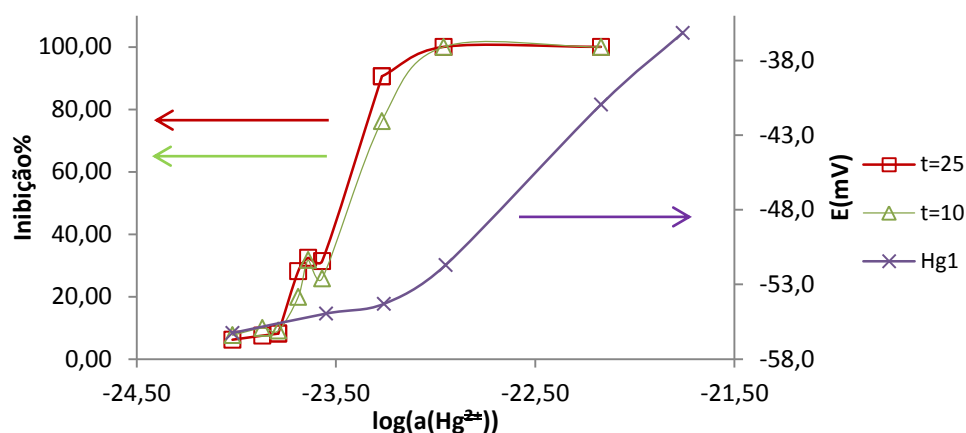


Figura 23: Potencial e inibição em função da atividade de mercúrio livre.

Comparando os dois métodos para as soluções da água do mar artificial, constata-se que o método biológico é mais sensível e aplicável para valores de atividade mais baixos. A toxicidade aguda de mercúrio para $t = 10$ e $t = 25$ é de $3,72 \times 10^{-24}$ e $3,31 \times 10^{-24}$ mol L⁻¹, respetivamente. O sensor potenciométrico demonstrou um limite de deteção na água do mar artificial de $2,50 \times 10^{-24}$ mol L⁻¹. Verificou-se que o sensor pode ser utilizado para a deteção da atividade de mercúrio correspondente a toxicidade aguda, para $t = 10$, embora esta atividade se encontre muito próxima ao limite de deteção.

4.8. Água da Ria de Aveiro

Até agora os ensaios realizados foram todos com água do mar artificial, no entanto esta difere da água da Ria de Aveiro, devido à existência de nutrientes e de ser um meio muito mais complexo.

As amostras de água do mar foram recolhidas em dois locais da Ria de Aveiro, uma perto da ponte da Barra junto à saída de Ria da Aveiro para o Oceano Atlântico, e outra na Murtosa na Bacia de Estarreja. A Bacia de Estarreja recebeu entre 1950 e 1984 efluentes altamente contaminados provenientes duma fábrica eletroquímica de produção de cloro. Embora a maior parte de mercúrio esteja atualmente imobilizado nos sedimentos da Bacia de Estarreja, é provável que a água nesta zona contenha mercúrio em concentrações mais elevadas, comparando com os níveis naturais.

Como já foi dito, as amostras foram filtradas de forma a tentar eliminar possíveis bactérias e matéria orgânica que poderiam interferir, quer com a bactéria *V. fischeri*, quer com os sensores potenciométricos.

Ambas as amostras da Ria de Aveiro, recolhidas na Barra e na Murtosa, foram analisadas de forma igual, utilizando os sensores potenciométricos, onde pretendeu-se quantificar o mercúrio livre, a concentração do sal e o pH. É muito importante determinar estes parâmetros, porque se pretendia ainda avaliar a toxicidade usando a bactéria *V. fischeri*, que tem comportamentos diferentes para diferentes salinidades e pH. Na Tabela 10 apresentam-se os resultados obtidos com os sensores potenciométricos, para as diferentes amostras

Tabela 10: A composição obtida para as amostras da água da Ria de Aveiro.

Amostra	B	BA	M	MA
$\log(a(\text{Hg}^{2+}))$, Hg1	$1,17 \times 10^{-17}$	$1,29 \times 10^{-17}$	$1,91 \times 10^{-17}$	$2,51 \times 10^{-17}$
$\log(a(\text{Hg}^{2+}))$, Hg2	$1,70 \times 10^{-17}$	$3,24 \times 10^{-17}$	$3,24 \times 10^{-17}$	$5,62 \times 10^{-17}$
$c(\text{Cl}^-)$ (M)	0,81	0,80	0,76	0,75
pH	7,89	2,08	7,81	2,03

É de salientar que as amostras com B e BA correspondem às amostras da Barra sem e com ácido, respetivamente, e as amostras com M e MA às amostras da Murtosa sem e com ácido, respetivamente.

A atividade de mercúrio na água do Ria foi calculada utilizando as calibrações na água do mar artificial feitas anteriormente, que se encontram na Figura 18. A concentração de cloreto e o pH foram calculadas através das calibrações que se encontram nas Figura 11 e Figura 10, respetivamente.

Para amostra recolhida na Barra, sem adição de ácido, a atividade de mercúrio foi de $(1,2 \pm 0,2) \times 10^{-17}$ e de $(1,7 \pm 0,9) \times 10^{-17}$ mol L⁻¹ para os elétrodo Hg1 e Hg2, respetivamente. Esta amostra tinha uma concentração de cloreto de $0,81 \pm 0,03$ mol L⁻¹ e um pH de $7,9 \pm 0,1$.

Em relação à amostra da Murtosa, a atividade de mercúrio obtido foi de $(1,9 \pm 0,6) \times 10^{-17}$ e de $(3,2 \pm 0,9) \times 10^{-17}$ mol L⁻¹ para os elétrodo Hg1 e Hg2, respetivamente. O pH desta amostra foi de $7,8 \pm 0,2$ e a concentração do cloreto de $0,76 \pm 0,03$ mol L⁻¹.

Em relação aos ensaios das amostras com pH baixo, aos quais se adicionou ácido nítrico, os resultados foram semelhantes aos anteriores, em termos de comparação das duas amostras. Para este caso, na amostra da Barra a atividade do mercúrio obtida foi de $(1,3 \pm 0,1) \times 10^{-17}$ e $(3,2 \pm 0,8) \times 10^{-17}$ mol L⁻¹ para os elétrodos Hg1 e Hg2, respetivamente. Esta amostra tem um pH de $2,08 \pm 0,01$ e uma concentração de cloreto de $0,80 \pm 0,03$ mol L⁻¹.

Para a amostra Murtosa com pH baixo, a atividade de mercúrio foi de $(2,5 \pm 0,4) \times 10^{-17}$ e de $(5,6 \pm 0,9) \times 10^{-17}$ mol L⁻¹, para os elétrodos Hg1 e Hg2, respetivamente. Em relação aos outros parâmetros, o pH foi de $2,03 \pm 0,03$ e a concentração de cloreto de $0,75 \pm 0,03$ mol L⁻¹.

Verifica-se que com a diminuição do pH, a atividade de mercúrio livre teve um ligeiro aumento, no entanto, este não é significativo. Verifica-se que na amostra da Murtosa a atividade de mercúrio livre é ligeiramente mais elevada que na da Barra, o que está de acordo com o esperado, pois é uma zona onde se sabe que a concentração de mercúrio nos sedimentos é mais elevada. Esta não é uma diferença considerável, de forma a serem diferentes em termos de atividade do mercúrio livre. Em relação à salinidade, esta é mais elevada na amostra da Barra, que também está de acordo com o esperado, pois esta está perto da ligação da Ria com o mar.

É de salientar que as atividades de mercúrio obtidas foram, me média, de $1,54 \times 10^{-17}$ e $2,58 \times 10^{-17}$ mol L⁻¹, para as amostras de Barra e Murtosa, respetivamente. Estes valores são improváveis, pois são demasiado altos para a água do mar. Os potenciais demasiados altos dos elétrodos seletivos ao mercúrio na água do mar natural podem dever-se à presença de matéria orgânica na água que poderá interferir com o sinal do eletrodo.

A luminescência da bactéria *V. fischeri* nestas amostras foi também medida, apresentam-se na Figura 24. No entanto, só se efetuou para as amostras em que o pH tinha um valor entre 7 e 8, caso contrário teria o pH efeito negativo na bactéria.

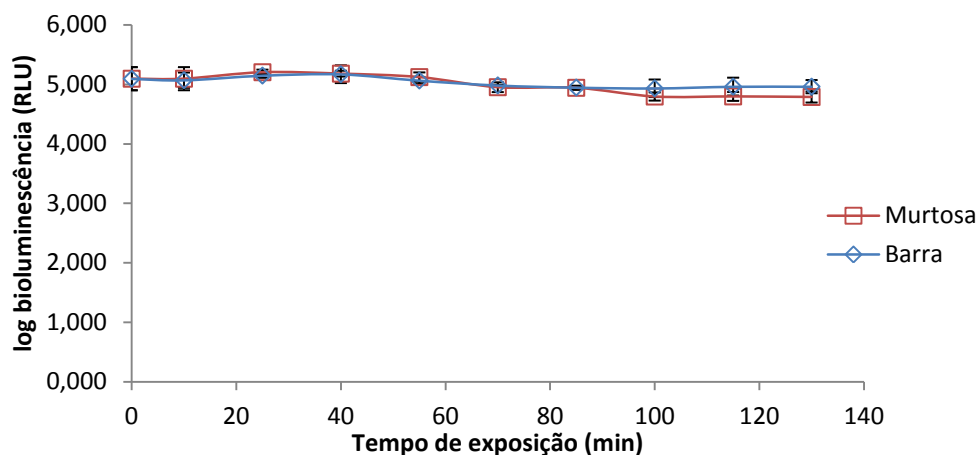


Figura 24: Resultados obtidos com a água da Ria de Aveiro na presença da bactéria *V. fischeri*.

Como se pode ver pelos resultados, na amostra da Barra e da Murtosa a atividade de mercúrio livre existente não foi suficiente para inibir a emissão de luz da bactéria *V. fischeri*. Comparando ambas as amostras, a luminescência manteve-se constante ao longo do tempo, apesar de para os minutos finais o ensaio da Murtosa ter apresentado um pequeno decréscimo, comparativamente ao da Barra. Apesar disto, considerando os intervalos de confiança dos ensaios da Barra e o pequeno decréscimo existente, não se pode considerar o mesmo significativo.

Conforme calibrações feitas anteriormente em água do mar artificial, que se podem ver na Figura 20, a atividade de mercúrio na água de Ria deveria ser inferior a $1,62 \times 10^{-24}$ mol L⁻¹. Por outro lado, o crescimento de bactéria pode ser influenciado pelos nutrientes presentes na água do mar natural, o que resulta que inibição na água de Ria menos drástica, quando comparada com a água do mar artificial.

4.9. Água da Ria de Aveiro com adição de Hg

Visto a diferença de mercúrio livre entre os dois ensaios não ser significativa, foi adicionado mercúrio à amostra da Barra, de forma a perceber o efeito de maiores atividades de Hg e obter um perfil para a água da Ria de Aveiro.

A atividade de mercúrio adicionado foi calculada utilizando o programa de especiação MINTEQA. Os cálculos foram feitos usando os principais compostos de água do mar com as concentrações ajustadas à concentração do cloreto determinado com eletrodo. As concentrações totais de mercúrio foram assumidas iguais a quantidade de

mercúrio adicionado, sem levar em conta o mercúrio que já estava presente em amostra.

Na Figura 25 apresentam-se os potenciais dos elétrodos obtidos para a água de Ria com as diferentes adições de Hg.

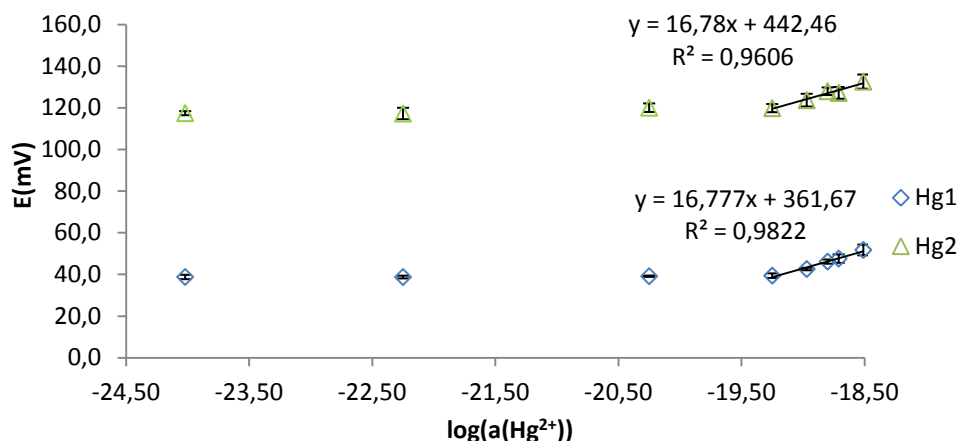


Figura 25: Potenciais obtidos para as amostras da água da Ria de Aveiro da Barra com adição de mercúrio.

Obteve-se um limite de detecção de $1,41 \times 10^{-20} \text{ mol L}^{-1}$ para o eletrodo Hg1, e $1,95 \times 10^{-20} \text{ mol L}^{-1}$ para o segundo, Hg2. Este limite de detecção é significativamente mais alto do que da água do mar artificial. Tal pode ser justificado pela influência de compostos orgânicos presentes na água natural que podem influenciar quer no potencial de eletrodo quer na especiação do mercúrio.

De seguida realizaram-se os ensaios com a bactéria *V. fischeri*, em que os resultados se podem ver na Figura 26.

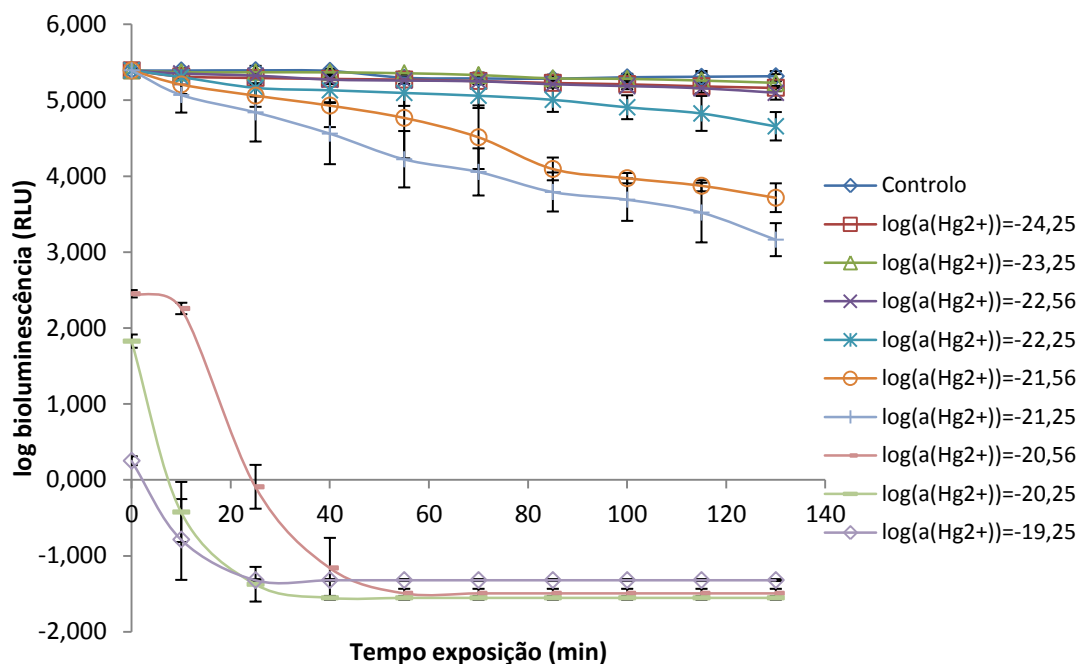


Figura 26: Inibição da emissão de luz da bactéria *V. fischeri* para amostras da água da Ria de Aveiro da Barra com adição de mercúrio.

Nos ensaios realizados com a bactéria *V. fischeri*, verificou-se que para atividades superiores a $5,62 \times 10^{-21} \text{ mol L}^{-1}$ o efeito foi imediato, resultando numa inibição total da emissão de luz. Para soluções em que a atividade variou entre $5,62 \times 10^{-23}$ e $5,62 \times 10^{-22} \text{ mol L}^{-1}$, a perda na emissão de luz aumentou ao longo do tempo, tendo um efeito gradual. Para atividades inferiores a $5,62 \times 10^{-23} \text{ mol L}^{-1}$ não se verificou qualquer efeito por parte do mercúrio na luminescência. De seguida, na Figura 27, representa-se a inibição da emissão de luz da bactéria *V. fischeri* em função da atividade, para diferentes tempos de exposição.

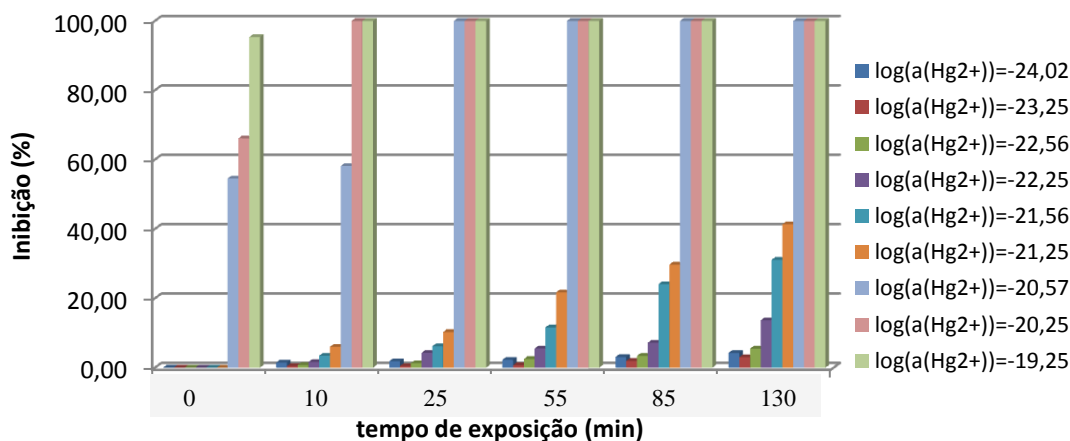


Figura 27: Inibição da luminescência para tempos de 0, 10, 25, 55, 85 e 130 minutos.

Comparando a inibição para os diferentes tempos, constata-se que o tempo ótimo para este ensaio é de 10 minutos. De forma a relacionar os dois métodos, sensores potenciométricos e sensor biológico, representou-se a inibição da luminescência, para $t=10$ minutos, e o potencial do eletrodo Hg1 em função da atividade do mercúrio livre, que se encontra na Figura 28.

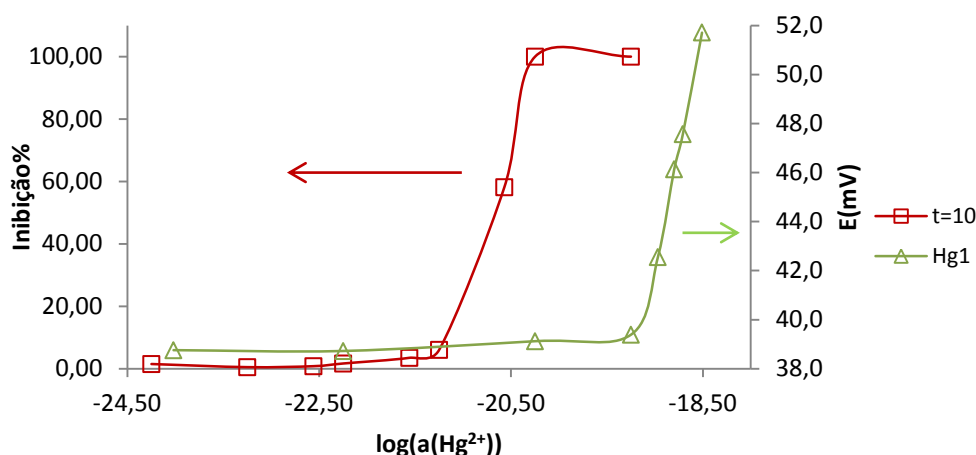


Figura 28: Inibição e potencial em função da atividade para água da Ria de Aveiro com adição de Hg.

Verifica-se que a toxicidade aguda, para $t = 10$ min, na água da Ria corresponde a atividade de mercúrio de $2,00 \times 10^{-21} \text{ mol L}^{-1}$. Este valor é significativamente mais alto do observado na água do mar artificial. Tal pode dever-se à presença de compostos orgânicos que complexam com o mercúrio alterando a especiação. Como a composição da matéria orgânica e as constantes de estabilidade dos complexos com o mercúrio não são conhecidos, estes dados não foram levados em conta nos cálculos com MINTEQA. O facto de ambas as respostas, do sensor potenciométrico e do ensaio biológico, deslocarem-se para atividades de mercúrio mais altas, confirma esta hipótese.

Comparando a resposta do sensor potenciométrico com a do ensaio biológico, verifica-se que na água da Ria de Aveiro o limite de deteção do sensor, em média, é de $1,41 \times 10^{-20} \text{ mol L}^{-1}$ e não permite determinar a atividade de mercúrio correspondente a toxicidade aguda, $2,00 \times 10^{-21} \text{ mol L}^{-1}$. Este aumento de limite de deteção na água natural, em comparação com o ensaio biológico, pode dever-se ao efeito dos compostos orgânicos na membrana de sensor. O desenvolvimento de procedimentos de descontaminação e

condicionamento que possam melhorar as características de sensor em água natural são necessários.

5. Conclusão

O objetivo deste trabalho consistiu na aplicação de eletrodo seletivo ao mercúrio para deteção do mercúrio na água do mar em níveis de atividade correspondentes a toxicidade para a biota. Toxicidade do mercúrio em meios salinos foi avaliada com o ensaio biológico, baseado na luminescência da bactéria marinha *V. fischeri*. As mesmas soluções foram medidas com os sensores eletrodos com membrana de vidro calcogeneto seletivos ao mercúrio, para relacionar estes dois métodos.

Nas análises da água do mar artificial com a bactéria *V. fischeri* verificou-se que a toxicidade aguda corresponde à atividade de mercúrio de $3,72 \times 10^{-24} \text{ mol L}^{-1}$. Para atividades superiores a $1,10 \times 10^{-23} \text{ mol L}^{-1}$ o efeito tóxico do mercúrio é imediato, enquanto que para atividades de mercúrio inferiores a $1,62 \times 10^{-24} \text{ mol L}^{-1}$ não apresentam toxicidade. Amostras de água do mar recolhidas nos dois locais da Ria de Aveiro, perto da saída para o mar e na Bacia de Estarreja, não apresentaram toxicidade para a bactéria *V. fischeri*. Em relação à água da Ria de Aveiro com o mercúrio adicionado, constatou-se que a toxicidade aguda corresponde a uma atividade de mercúrio mais alta, de $2,00 \times 10^{-21} \text{ mol L}^{-1}$.

O sensor potenciométrico demonstrou uma gama de trabalho de $1,00 \times 10^{-23}$ a $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de Hg^{2+} , com um limite de deteção, na água de mar artificial, em média, de $2,65 \times 10^{-24} \text{ mol L}^{-1}$. No entanto, na água da Ria de Aveiro este limite é superior e foi em média de $1,68 \times 10^{-20} \text{ mol L}^{-1}$.

Verificou-se que o sensor potenciométrico pode ser aplicado para determinação de atividades de mercúrio correspondentes à toxicidade aguda na água do mar artificial, embora este esteja próximo do limite de deteção de eletrodo.

A resposta do sensor potenciométrico e do ensaio biológico na água da Ria com o mercúrio adicionado deslocou-se para atividades de mercúrio mais altas, o que pode dever-se à presença de matéria orgânica capaz de formar complexos com o mercúrio. O sensor potenciométrico na água da Ria de Aveiro com o mercúrio adicionado, não permite determinar de atividade de mercúrio correspondente à toxicidade aguda.

O sensor potenciométrico tem uma gama de aplicação superior ao sensor biológico, no entanto, não é aplicável para atividade de mercúrio livre inferiores à toxicidade aguda. O sensor biológico apesar de ter uma gama de aplicação mais reduzida, é aplicável para atividade baixas, correspondentes à toxicidade crónica.

6. *Referências*

1. Sarkar B., Heavy metals in the environment. 2002: Marcel Dekker.
2. Geyer R. A., Marine Environmental Pollution: Dumping and mining. 1981: Elsevier Scientific Pub. Co.
3. Walsh P. J., Smith S. L., and Fleming L. E., Oceans and human health: risks and remedies from the seas. 2008: Academic Press/Elsevier.
4. Ebdon L., Trace element speciation for environment, food and health. 2001: Royal Society of Chemistry.
5. Lew K., Mercury. 2008: ROSEN PUB GROUP.
6. Deocadiz E. S., Diaz V. R. , and Otico P. F. J., ASEAN MARINE WATER QUALITY CRITERIA FOR MERCURY. 1999.
7. Eisler R., Mercury hazards to living organisms. 2006: CRC/Taylor & Francis.
8. Pereira M. E., Lillebo A. I., Pato P., Válega M., Coelho J. P., Lopes C. B., Rodrigues S., Cachada A., Otero M., Pardal M. A., and Duarte A. C., Mercury pollution in Ria de Aveiro (Portugal): a review of the system assessment. Environmental Monitoring and Assessment, 2008. 155(1-4): p. 39-49.
9. Horvat M., Speciation of mercury in surface and deep-sea waters in the Mediterranean Sea. Atmospheric Environment, 2003. 37: p. 93-108.
10. Quevauviller P, Method performance studies for speciation analysis. 1998: Royal Society of Chemistry, Information Services.
11. Kungolos A., Aoyama I., and Muramoto S., Toxicity of Organic and Inorganic Mercury to *Saccharomyces cerevisiae*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1999. 43: p. 149-155.
12. Drevnick P., Roberts A., Otter R., Hammerschmidt C., Klaper R., and Oris J., Mercury toxicity in livers of northern pike (*Esox lucius*) from Isle Royale, USA. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2008.
13. Leopold K., Foulkes M., and Worsfold P., Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters—A review. Analytica Chimica Acta, 2010. 663(2): p. 127-138.

Referências

14. Whalin L., Kim E. H., and Mason R., Factors influencing the oxidation, reduction, methylation and demethylation of mercury species in coastal waters. *Marine Chemistry*, 2007. 47: p. 278–294.
15. Ravichandran M., Interactions between mercury and dissolved organic matter—a review. *Chemosphere*, 2004. 55(3): p. 319-331.
16. Conaway C., Mercury speciation in the San Francisco Bay estuary. *Marine Chemistry*, 2003. 80(2-3): p. 199-225.
17. Covelli S., Acquavita A., Piani R., Predonzani S., and Cinzia V., Recent contamination of mercury in an estuarine environment (Marano lagoon, Northern Adriatic, Italy). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2009. 82(2): p. 273-284.
18. Abreu S. N., Pereira E., Vale C., and Duarte A. C., Accumulation of Mercury in Sea Bass from a Contaminated Lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). *Marine Pollution Bulletin*, 2000. 40: p. 293-297.
19. Laporte J. M., Andres S., and Mason R. P., Effect of ligands and other metals on the uptake of mercury and methylmercury across the gills and the intestine of the blue crab (*Callinectes sapidus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2002. 131: p. 185–196.
20. Uría J. E. S. and Sanz-Medel A., Inorganic and methylmercury speciation in environmental samples. *Talanta*, 1998. 47: p. 509–524.
21. Holmes P., James K. A. F., and Levy L. S., Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health? *Science of The Total Environment*, 2009. 408(2): p. 171-182.
22. Warnick S. L., B.H.L., The acute toxicity of some heavy metals to different species of aquatic insects. *Water Pollution Control Federation*, 1969. 41(2): p. 280-284.
23. Parvez S., Venkataraman C., and Mukherji S., A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment International*, 2006. 32(2): p. 265-268.
24. Farré M. and Barceló D., Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2003. 22(5): p. 299-310.
25. Lei Y., Chen W., and Mulchandani A., Microbial biosensors. *Analytica Chimica Acta*, 2006. 568(1-2): p. 200-210.

Referências

26. Su L., Jia W., Hou C., and Lei Y., Microbial biosensors: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011. 26(5): p. 1788-1799.
27. Shimomura O., *Bioluminescence: chemical principles and methods*. 2006: World Scientific.
28. Hernando M., Malato O., Farre M., Fernandezalba A., and Barcelo D., Application of ring study: Water toxicity determinations by bioluminescence assay with *Vibrio fischeri*. *Talanta*, 2006. 69(2): p. 370-376.
29. Brovko L., *Bioluminescence for food and environmental microbiological safety*. 2007: SPIE.
30. Scheerer S., Gomez F., and Lloyd D., Bioluminescence of *Vibrio fischeri* in continuous culture: Optimal conditions for stability and intensity of photoemission. *Journal of Microbiological Methods*, 2006. 67(2): p. 321-329.
31. Bothner M. H., R.D.E., Mercury contamination of sea water samples stored in polyethylene containers. *Anal. Chem*, 1975. 47(3): p. 592–595.
32. Lindqvist O., R.H., Atmospheric mercury-a review. *Tellus B*, 1985. 37B(3): p. 136–159.
33. Bakker E. and Pretsch E., Potentiometric sensors for trace-level analysis. *Trac Trends in Analytical Chemistry*, 2005. 24(3): p. 199-207.
34. Skoog D. A. and West D. M., *Fundamentals of analytical chemistry*. 2004: Thomson-Brooks/Cole.
35. Antonisse M. M. G. and Reinhoudt D. N., Potentiometric Anion Selective Sensors. *Electroanalysis*, 1999. 11: p. 1035-1048.
36. Brett C. M. A. and Brett A. M. O., *Electrochemistry: principles, methods, and applications*. 1993: Oxford University Press.
37. Vogel A. I. and Jeffery G. H., *Vogel's textbook of quantitative chemical analysis*. 1989: Longman Scientific & Technical.
38. Vogel A. I., *Análise química quantitativa*. 1992: Guanabara Koogan.
39. Morf W. E., *The principles of ion-selective electrodes and of membrane transport*. 1981: Akadémiai Kiadó.
40. Hansen S., Pedersen-Bjergaard S., and Rasmussen K., *Chemical Analysis in Pharmaceutical Sciences*. 2012: John Wiley & Sons.
41. Vijayasathya P. R., *Engineering Chemistry*. 2008: Prentice-Hall Of India Pvt. Ltd.

Referências

42. Miloshova M., Bychkov E., Tsegelnik V., Strykanov V., Klewe-Nebenius H., Bruns M., Hoffmann W., Papet P., Sarradin J., Pradel A., and Ribes M., Tracer and surface spectroscopy studies of sensitivity mechanism of mercury ion chalcogenide glass sensors. *Sensors and Actuators*, 1999. 57: p. 171–178.
43. De Marco R. and Shackleton J., Calibration of the Hg chalcogenide glass membrane ion-selective electrode in seawater media. *Talanta*, 1999. 49: p. 385–391.
44. Legin A.V., Bychkov E.A., and Vlasov Y.G., Analytical applications of chalcogenide glass chemical sensors in environmental monitoring and process control. *Sensors and Actuators* 1995. B (242.5): p. 309-311.
45. De Marco R., Pejcic B., Prince K., and V., R.A., A multi-technique surface study of the mercury(ii) chalcogenide ion-selective electrode in saline media. *The Analyst*, 2003. 128(6): p. 742-749.
46. Cavanaugh G. M. *Formulae and Methods VI. The Marine Biological Laboratory*, Woods Hole, USA. 1975.

*Anexo: Tabelas auxiliares***Tabela A1:** Logaritmo da concentração de complexos na água do mar artificial, com a concentração total de mercúrio de $9,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, para pH diferentes.

<i>pH</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
HgOH₂	-21,8	-19,8	-17,8	-15,8	-13,8	-11,8	-9,8	-7,8	-5,8
NaCO₃⁻	-16,6	-14,6	-12,6	-10,6	-8,7	-6,9	-5,6	-4,6	-3,8
NaHCO₃ (aq)	-8,8	-7,8	-6,8	-5,8	-4,8	-4,1	-3,8	-3,8	-4,0
Hg²⁺	-17,6	-17,6	-17,6	-17,6	-17,6	-17,6	-17,6	-17,6	-17,6
OH⁻	-13,0	-12,0	-11,0	-10,0	-9,0	-8,0	-7,0	-6,0	-5,0
HgOH⁺	-20,0	-19,0	-18,0	-17,0	-16,0	-15,0	-14,0	-13,0	-12,0
Hg(OH)₃⁻	-35,7	-32,7	-29,7	-26,7	-23,7	-20,7	-17,7	-14,7	-11,7
MgOH⁺	-12,7	-11,8	-10,8	-9,8	-8,8	-7,8	-6,8	-5,8	-4,8
CaOH⁺	-14,4	-13,4	-12,4	-11,4	-10,4	-9,4	-8,4	-7,4	-6,4
HgCl⁺	-10,8	-10,8	-10,8	-10,8	-10,8	-10,8	-10,8	-10,8	-10,8
HgCl₂ (aq)	-4,6	-4,6	-4,6	-4,6	-4,6	-4,6	-4,6	-4,6	-4,7
HgCl₃⁻	-4,2	-4,2	-4,2	-4,2	-4,2	-4,2	-4,2	-4,2	-4,2
HgCl₄²⁻	-4,1	-4,1	-4,1	-4,1	-4,1	-4,1	-4,1	-4,1	-4,1
HgClOH (aq)	-12,9	-11,9	-10,9	-9,9	-8,9	-7,9	-6,9	-5,9	-4,9
HgBr⁺	-10,2	-10,2	-10,2	-10,2	-10,2	-10,2	-10,2	-10,2	-10,2
HgBr₂ (aq)	-3,9	-3,9	-3,9	-3,9	-3,9	-3,9	-3,9	-3,9	-3,9
HgBr₃⁻	-3,7	-3,7	-3,7	-3,7	-3,7	-3,7	-3,7	-3,7	-3,7
HgBr₄²⁻	-4,6	-4,7	-4,6	-4,6	-4,6	-4,6	-4,6	-4,7	-4,7
HgBrCl (aq)	-4,3	-4,3	-4,3	-4,3	-4,3	-4,3	-4,3	-4,3	-4,3
HgBrOH (aq)	-12,6	-11,6	-10,6	-9,6	-8,6	-7,6	-6,6	-5,6	-4,6
HSO₄⁻	-2,0	-2,7	-3,6	-4,6	-5,6	-6,6	-7,6	-8,6	-9,6
HgSO₄ (aq)	-18,2	-17,8	-17,8	-17,7	-17,7	-17,7	-17,7	-17,7	-17,8
MgSO₄ (aq)	-2,7	-2,4	-2,3	-2,3	-2,3	-2,3	-2,3	-2,3	-2,3
CaSO₄ (aq)	-3,3	-3,0	-2,9	-2,9	-2,9	-2,9	-2,9	-2,9	-2,9
NaSO₄⁻	-2,8	-2,4	-2,3	-2,3	-2,3	-2,3	-2,3	-2,3	-2,3
KSO₄⁻	-4,2	-4,1	-4,0	-4,0	-4,0	-4,0	-4,0	-4,0	-4,0
HCO₃⁻	-8,1	-7,1	-6,1	-5,1	-4,1	-3,3	-3,1	-3,0	-3,2
H₂CO₃ (aq)	-2,7	-2,7	-2,7	-2,7	-2,8	-3,0	-3,7	-4,7	-5,9
HgCO₃ (aq)	-22,9	-20,9	-18,9	-16,9	-14,9	-13,2	-11,9	-10,9	-10,1
Hg(CO₃)₂²⁻	-36,8	-32,8	-28,8	-24,8	-20,9	-17,3	-14,8	-12,7	-11,1
HgHCO₃⁺	-19,6	-18,6	-17,6	-16,6	-15,7	-14,9	-14,6	-14,6	-14,8
MgCO₃ (aq)	-16,4	-14,4	-12,4	-10,4	-8,4	-6,7	-5,4	-4,4	-3,6
MgHCO₃⁺	-8,9	-8,0	-7,0	-6,0	-5,0	-4,3	-4,0	-4,0	-4,1
CaHCO₃⁺	-9,7	-8,8	-7,8	-6,8	-5,8	-5,0	-4,8	-4,7	-4,9
CaCO₃ (aq)	-16,9	-15,0	-13,0	-11,0	-9,0	-7,2	-5,9	-4,9	-4,1

Tabela A2: Logaritmo da concentração de complexos na água do mar artificial, com a concentração total de mercúrio de $1,00 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, para pH diferentes.

<i>pH</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
HgOH₂	-28,2	-26,2	-24,2	-22,2	-20,2	-18,2	-16,2	-14,2	-12,2
NaCO₃⁻	-16,4	-14,4	-12,4	-10,4	-8,4	-6,7	-5,4	-4,4	-3,6
NaHCO₃ (aq)	-8,5	-7,6	-6,6	-5,6	-4,6	-3,9	-3,6	-3,6	-3,8
Hg²⁺	-24,0	-24,0	-24,0	-24,0	-24,0	-24,0	-24,0	-24,0	-24,0
OH⁻	-13,0	-12,0	-11,0	-10,0	-9,0	-8,0	-7,0	-6,0	-5,0
HgOH⁺	-26,4	-25,4	-24,4	-23,4	-22,4	-21,4	-20,4	-19,4	-18,4
Hg(OH)₃⁻	-42,2	-39,1	-36,1	-33,1	-30,1	-27,1	-24,1	-21,1	-18,1
MgOH⁺	-12,6	-11,7	-10,7	-9,7	-8,7	-7,7	-6,7	-5,7	-4,7
CaOH⁺	-14,3	-13,3	-12,3	-11,3	-10,3	-9,3	-8,3	-7,3	6,3
HgCl⁺	-17,2	-17,2	-17,2	-17,2	-17,2	-17,2	-17,2	-17,2	-17,2
HgCl₂ (aq)	-10,9	-10,9	-10,9	-10,9	-10,9	-10,9	-10,9	-10,9	-10,9
HgCl₃⁻	-10,4	-10,4	-10,4	-10,4	-10,4	-10,4	-10,4	-10,4	-10,4
HgCl₄²⁻	-10,2	-10,2	-10,2	-10,2	-10,2	-10,2	-10,2	-10,2	-10,2
HgClOH (aq)	-19,2	-18,2	-17,2	-16,2	-15,2	-14,2	-13,2	-12,2	-11,2
HgBr⁺	-15,5	-15,5	-15,5	-15,5	-15,5	-15,5	-15,5	-15,5	-15,5
HgBr₂ (aq)	-8,1	-8,1	-8,1	-8,1	-8,1	-8,1	-8,1	-8,1	-8,1
HgBr₃⁻	-6,8	-6,8	-6,8	-6,8	-6,8	-6,8	-6,8	-6,8	-6,8
HgBr₄²⁻	-6,6	-6,6	-6,6	-6,6	-6,6	-6,6	-6,6	-6,6	-6,6
HgBrCl (aq)	-9,6	-9,6	-9,6	-9,6	-9,6	-9,6	-9,6	-9,6	-9,6
HgBrOH (aq)	-17,9	-16,9	-15,9	-14,9	-13,9	-12,9	-11,9	-10,9	-9,9
HSO₄⁻	-2,0	-2,6	-3,6	-4,6	-5,6	-6,6	-7,6	-8,6	-9,6
HgSO₄ (aq)	-24,6	-24,2	-24,2	-24,2	-24,2	-24,2	-24,2	-24,2	-24,2
MgSO₄ (aq)	-2,5	-2,2	-2,2	-2,2	-2,2	-2,2	-2,2	-2,2	-2,2
CaSO₄ (aq)	-3,2	-2,9	-2,8	-2,8	-2,8	-2,8	-2,8	-2,8	-2,8
NaSO₄⁻	-2,6	-2,2	-2,2	-2,2	-2,2	-2,2	-2,2	-2,2	-2,2
KSO₄⁻	-4,3	-4,0	-3,9	-3,9	-3,9	-3,9	-3,9	-3,9	-3,9
HCO₃⁻	-8,0	-7,0	-6,0	-5,0	-4,0	-3,3	-3,0	-3,0	-3,2
H₂CO₃ (aq)	-2,6	-2,6	-2,6	-2,6	-2,7	-2,9	-3,7	-4,6	-5,8
HgCO₃ (aq)	-29,3	-27,3	-25,3	-23,3	-21,3	-19,5	-18,3	-17,3	-16,5
Hg(CO₃)₂²⁻	-43,1	-39,1	-35,1	-31,1	-27,1	-23,6	-21,1	-19,1	-17,5
HgHCO₃⁺	-26,0	-25,0	-24,0	-23,0	-22,0	-21,3	-21,0	-21,0	-21,2
MgCO₃ (aq)	-16,2	-14,2	-12,2	-10,2	-8,3	-6,5	-5,2	-4,2	-3,4
MgHCO₃⁺	-8,7	-7,8	-6,8	-5,8	-4,8	-4,1	-3,8	-3,8	-4,0
CaHCO₃⁺	-9,5	-8,6	-7,6	-6,6	-5,6	-4,9	-4,6	-4,6	-4,8
CaCO₃ (aq)	-16,7	-14,8	-12,8	-10,8	-8,8	-7,1	-5,8	-4,8	-4,0

Tabela A3: Logaritmo da concentração de complexos em soluções de nitrato mercúrio com a concentração de $6,31 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para pH diferentes.

<i>pH</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>	<i>8</i>	<i>9</i>
HgNO₃	-6,91	-6,68	-6,86	-8,31	-10,27	-12,27	-14,27	-16,27	-18,27
Hg(NO₃)₂	-9,39	-9,11	-9,27	-10,72	-12,69	-14,69	-16,68	-18,69	-20,69
Hg⁺²	-4,38	-4,20	-4,39	-5,84	-7,81	-9,81	-11,81	-13,81	-15,81
HgOH	-6,78	-5,60	-4,79	-5,24	-6,21	-7,30	-8,20	-9,20	-10,20
Hg(OH)₂	-8,58	-6,39	-4,58	-4,04	-4,00	-4,00	-4,00	-4,00	-4,00

Tabela A4: Potenciais do eletrodo de pH obtidos em soluções tampão padrão.

<i>pH</i>	<i>Medição (mV)</i>		<i>Média</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
	<i>1º</i>	<i>2º</i>			
7	-1	-0,6	-0,8	0,3	0,4
4	168	168,1	168,1	0,1	0,1
2	282,7	283,2	283	0,4	0,5

Tabela A5: Potenciais do eletrodo seletivo ao cloreto obtidos em soluções de cloreto de sódio.

<i>-pCl</i>	<i>Medição (mV)</i>			<i>Média</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
	<i>1º</i>	<i>2º</i>	<i>3º</i>			
-2,00	133,5	137,0	130,9	133,8	3,0	3,4
-1,30	101,7	106,4	100,3	102,8	3,2	3,6
-1,00	89,0	92,3	87,2	89,5	2,6	2,9
-0,64	72,0	73,1	70,1	71,6	2,2	3,0
-0,30	54,0	56,8	55,8	55,5	1,4	1,6
0,00	40,9	42,0	42,2	41,7	0,7	0,8

Anexo

Tabela A6: Potenciais de elétrodos seletivos ao mercúrio obtidos em soluções de nitrato de mercúrio com pH 2.

<i>Elétrodo</i>	<i>Log(a(Hg²⁺))</i>	<i>Medição (mV)</i>				<i>Média</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>	<i>pH</i>
		<i>1º</i>	<i>2º</i>	<i>3º</i>	<i>4º</i>				
Hg1	-7,2	170,1	189,4	191,8	192,1	185,8	7,9	7,7	1,80±0,00
	-6,2	190,3	215,8	218,0	221,1	211,3	10,5	10,3	1,77±0,01
	-5,5	247,4	244,8	240,7	221,4	238,6	8,6	8,4	1,75±0,01
	-5,2	258,0	258,3	250,0	244,3	252,6	5,5	5,4	1,73±0,02
	-4,5	268,4	270,1	283,9	270,9	273,3	5,3	5,2	1,66±0,05
	-4,2	292,3	300,7	306,0	292,4	297,8	5,5	5,4	1,63±0,03
Hg2	-7,2	226,0	245,1	237,1	234,2	235,6	5,5	5,4	1,80±0,00
	-6,2	289,9	272,2	263,3	263,7	272,3	8,8	8,6	1,77±0,01
	-5,7	305,2	301,7	287,7	264,5	289,8	13,7	13,4	1,75±0,01
	-5,2	315,0	299,4	293,8	287,1	298,8	8,4	8,2	1,73±0,02
	-4,7	316,9	322,2	332,7	318,0	322,4	5,1	5,0	1,66±0,05
	-4,2	343,2	339,5	340,9	341,9	341,4	1,2	1,2	1,63±0,03

Tabela A7: Potenciais dos elétrodos seletivos ao mercúrio obtidos em amostras de água do mar artificial para pH 2.

<i>Elétrodo</i>	<i>-pHg</i>	<i>1º</i>	<i>2º</i>	<i>3º</i>	<i>Média (mV)</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>	<i>pH médio</i>
		<i>Medição (mV)</i>	<i>Medição (mV)</i>	<i>Medição (mV)</i>				
Hg1	-24,53	-64,2	-65,0	-62,7	-64,0	1,2	1,4	1,73±0,09
	-22,54	-63,0	-67,1	-63,8	-64,6	2,2	2,4	1,75±0,04
	-21,49	-47,8	-52,1	-48,3	-49,4	2,4	2,7	1,85±0,05
	-18,83	-21,0	-24,4	-20,2	-21,9	2,2	2,5	1,85±0,04
	-17,15	33,1	26,9	29,3	29,7	3,2	3,6	1,75±0,11
	-14,82	84,4	82,0	86,0	84,1	2,0	2,3	1,84±0,06
	-13,30	154,3	146,2	149,1	149,8	4,1	4,6	1,80±0,05
Hg2	-24,53	-72,9	-73,7	-66,8	-71,1	3,8	4,3	1,73±0,09
	-22,54	-68,7	-77,0	-66,8	-70,8	5,4	6,1	1,75±0,04
	-21,49	-50,2	-52,6	-50,5	-51,1	1,3	1,5	1,85±0,05
	-18,83	-17,1	-19,2	-18,9	-18,4	1,1	1,3	1,85±0,04
	-17,15	46,2	44,2	40,2	43,5	3,1	3,5	1,75±0,11
	-14,82	106,9	101,7	108,2	105,6	3,4	3,9	1,84±0,06
	-13,30	165,9	163,0	166,6	165,2	1,9	2,2	1,80±0,05

Anexo

Tabela A8: Potenciais dos elétrodos seletivos ao mercúrio obtidos em amostras de água do mar artificial para pH 7.

<i>Elétrodo</i>	<i>-pHg</i>	<i>1º Medição (mV)</i>	<i>2º Medição (mV)</i>	<i>Média (mV)</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>	<i>pH médio</i>
Hg1	-24,53	-62,0	-64,3	-63,1	1,2	1,6	6,71±0,09
	-22,54	-63,0	-65,7	-64,3	1,4	1,9	6,78±0,02
	-21,49	-46,1	-48,8	-47,4	1,4	1,9	6,82±0,07
	-18,83	-13,9	-17,2	-15,5	1,6	2,3	6,83±0,02
	-17,15	40,7	34,9	37,8	2,9	4,0	6,80±0,09
	-14,82	91,7	91,7	91,7	0,0	0	6,87±0,12
	-13,30	138,4	132,6	135,5	2,9	4,1	6,82±0,05
Hg2	-24,53	-72,6	-75,7	-74,1	1,6	2,2	6,71±0,09
	-22,54	-70,4	-76,3	-73,3	2,9	4,1	6,78±0,02
	-21,49	-48,7	-51,1	-49,9	1,2	1,7	6,82±0,07
	-18,83	-16,4	-16,3	-16,4	0,3	0,5	6,83±0,02
	-17,15	49,0	47,9	48,4	0,6	0,8	6,80±0,09
	-14,82	109,7	110,2	109,9	0,2	0,3	6,87±0,12
	-13,30	160,2	158,6	159,4	0,8	1,1	6,82±0,05

Tabela A9: Potenciais dos elétrodos seletivos ao mercúrio obtidos em amostras preparadas com água do mar artificial.

<i>Elétrodo</i>	<i>-pHg</i>	<i>1º Medição (mV)</i>	<i>2º Medição (mV)</i>	<i>3º Medição (mV)</i>	<i>Média (mV)</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de Confiança</i>	<i>pH médio</i>
Hg1	-24,0	-58,2	-56,1	-56,0	-56,7	1,2	1,4	7,76±0,06
	-22,9	-54,9	-52,8	-53,8	-53,8	1,1	1,2	7,41±0,12
	-22,2	-44,8	-43,9	-44,2	-44,3	0,5	0,5	7,33±0,17
	-21,8	-37,9	-38,4	-37,8	-38,0	0,3	0,4	7,18±0,09
	-20,8	-23,7	-26,3	-25,9	-25,3	1,4	1,6	2,09±0,14
	-19,4	-10,8	-12,8	-10,4	-11,3	1,3	1,4	2,02±0,18
	-18,8	5,0	5,9	7,5	6,1	1,3	1,5	2,02±0,08
	-17,6	18,1	18,8	16,7	17,9	1,1	1,2	1,83±0,07
Hg2	-24,0	11,0	19,0	20,2	16,7	5,0	5,7	7,76±0,06
	-22,9	12,7	20,1	20,9	17,9	4,5	5,1	7,41±0,12
	-22,2	22,9	30,4	31,3	28,2	4,6	5,2	7,33±0,17
	-21,8	28,9	35,3	37,2	33,8	4,4	4,9	7,18±0,09
	-20,8	39,6	45,9	49,8	45,1	5,1	5,8	2,09±0,14
	-19,4	62,0	62,7	65,8	63,5	2,0	2,3	2,02±0,18
	-18,8	83,9	83,2	84,9	84,0	0,9	1,0	2,02±0,08
	-17,6	90,1	91,8	92,1	91,3	1,1	1,2	1,83±0,07

Anexo

Tabela A10: Potenciais dos elétrodos seletivos ao mercúrio obtidos em amostras preparadas com água do mar artificial.

<i>Elétrodo</i>	<i>-pHg</i>	<i>1° Medição (mV)</i>	<i>2° Medição (mV)</i>	<i>3° Medição (mV)</i>	<i>Média (mV)</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>	<i>pH médio</i>
Hg1	-24,02	-59,1	-63,6	-64,3	-62,3	2,8	3,2	7,35±0,24
	-23,87	-59,3	-64,1	-65,3	-62,9	3,2	3,6	7,36±0,24
	-23,79	-59,9	-63,1	-66,3	-63,1	3,2	3,6	7,27±0,26
	-23,69	-60,6	-64,1	-65,5	-63,4	2,5	2,8	7,20±0,32
	-23,64	-61,4	-64,8	-64,4	-63,5	1,9	2,1	7,12±0,31
	-23,57	-61,8	-64,9	-65,3	-64,0	1,9	2,2	7,05±0,07
	-23,27	-63,1	-63,1	-65,2	-63,8	1,2	1,4	7,03±0,10
	-22,96	-63,0	-64,9	-64,1	-64,0	0,9	1,0	6,98±0,06
	-22,17	-48,1	-50,7	-49,3	-49,3	1,3	1,4	6,97±0,02
Hg1	-24,02	13,0	8,9	7,7	9,9	2,8	3,2	7,35±0,24
	-23,87	13,2	8,3	7,9	9,8	3,0	3,3	7,36±0,24
	-23,79	11,0	8,7	6,8	8,8	2,1	2,4	7,27±0,26
	-23,69	6,6	9,2	6,9	7,5	1,4	1,6	7,20±0,32
	-23,64	6,4	8,4	7,9	7,5	1,1	1,2	7,12±0,31
	-23,57	6,2	8,8	6,9	7,3	1,4	1,6	7,05±0,07
	-23,27	6,0	8,2	7,9	7,4	1,2	1,3	7,03±0,10
	-22,96	6,8	8,4	8,4	7,9	0,9	1,0	6,98±0,06
	-22,17	22,9	23,1	24,9	23,6	1,1	1,3	6,97±0,02

Tabela A11: Potenciais dos elétrodos seletivos ao mercúrio obtidos nas amostras da água de Ria de Aveiro.

<i>Elétrodo</i>	<i>Amostra</i>	<i>1° Medição (mV)</i>	<i>2° Medição (mV)</i>	<i>3° Medição (mV)</i>	<i>Média (mV)</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>	<i>pH médio</i>
Hg1	B	32,1	33,7	33,4	33,0	0,9	1,0	7,89±0,11
	BA	33,5	33,3	34,2	33,6	0,5	0,5	2,08±0,01
	M	33,9	35,5	39,3	36,2	2,8	3,2	7,81±0,20
	MA	37,3	38,1	38,8	38,1	0,7	0,7	2,03±0,03
Hg2	B	104,4	100,7	101,6	102,2	1,9	2,2	7,89±0,11
	BA	105,1	106,1	107,2	106,1	1,0	1,2	2,08±0,01
	M	106,2	105,0	107,2	106,1	1,1	1,3	7,81±0,20
	MA	108,9	109,3	110,2	109,5	0,6	0,7	2,03±0,03

Tabela A12: Potenciais do eléctrodo seletivo ao cloreto obtidos nas amostras de água da Ria de Aveiro.

<i>Amostra</i>	<i>1º Medição (mV)</i>	<i>2º Medição (mV)</i>	<i>3º Medição (mV)</i>	<i>Média (mV)</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
B	46,3	45,8	47,1	46,4	0,7	0,7
BA	45,8	46,8	47,3	46,4	0,8	0,9
M	47,0	48,0	48,1	47,7	0,6	0,7
MA	47,1	48,2	48,7	48,0	0,8	0,9

Tabela A13: Potenciais de eléctrodos seletivos ao mercúrio e ao cloreto obtidos nas amostras de água da Ria de Aveiro com adição de mercúrio.

<i>Eléctrodo</i>	<i>Atividade</i>	<i>1º Medição (mV)</i>	<i>2º Medição (mV)</i>	<i>3º Medição (mV)</i>	<i>Média (mV)</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
Hg1	-22,25	38	39,2	39,1	38,7	0,7	0,8
	-20,25	38,8	39,1	39,5	39,1	0,3	0,4
	-19,25	38,2	39,8	40,3	39,4	1,1	1,2
	-18,97	42	43,2	42,6	42,6	0,6	0,7
	-18,8	45,9	47,3	45,3	46,1	1	1,2
	-18,71	49,9	47	45,9	47,6	2	2,3
	-18,51	53	53,4	48,8	51,7	2,6	2,9
Hg2	-22,25	114,1	118,6	119,1	117,2	2,8	3,1
	-20,25	122,1	118	119,9	120	2,1	2,3
	-19,25	122	119,2	118,3	119,8	2	2,2
	-18,97	127,2	122	121,8	123,6	3,1	3,5
	-18,8	128,8	129,1	125,8	127,9	1,8	2,1
	-18,71	130,4	125,1	125,9	127,1	2,8	3,2
	-18,51	134	135	128,7	132,5	3,4	3,9
Cl	-22,25	46,6	46,3	46,4	46,4	0,2	0,2
	-20,25	45	44,9	44,3	44,7	0,4	0,4
	-19,25	46,6	46,1	46,1	46,3	0,2	0,3
	-18,97	47,2	48	48	47,7	0,5	0,5
	-18,8	48,4	48	48,9	48,4	0,5	0,5
	-18,71	49,3	50,9	50,6	50,2	0,8	0,9
	-18,51	50,2	51,9	54,6	52,2	2,2	2,5

Tabela A14: Ensaio de luminescência para o controle, água do mar artificial.

<i>Tempo de irradiação (min)</i>	<i>Luminescência</i>					<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
	<i>Média 1º ensaio</i>	<i>Média 2º ensaio</i>	<i>Média 3º ensaio</i>	<i>Média</i>	<i>Log(média)</i>		
0	132550	193833	200517	175633	5,245	0,100	0,113
10	179242	248350	209983	212525	5,327	0,071	0,080
25	151910	260650	231617	214726	5,332	0,123	0,139
40	188583	188303	254350	210412	5,323	0,075	0,085
55	199058	220833	183602	201164	5,304	0,040	0,045
70	198358	224750	223033	215381	5,333	0,030	0,034
85	199053	231733	224717	218501	5,339	0,035	0,039
100	198975	219750	228983	215903	5,334	0,031	0,035
115	198758	223450	227633	216614	5,336	0,032	0,036
130	198800	217750	217550	211367	5,325	0,023	0,026

Tabela A15: Ensaio de luminescência para a amostra com concentração total de mercúrio de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e logaritmo da atividade de -24,02.

<i>Tempo de irradiação (min)</i>	<i>Luminescência</i>					<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
	<i>Média 1º ensaio</i>	<i>Média 2º ensaio</i>	<i>Média 3º ensaio</i>	<i>Média</i>	<i>Log(média)</i>		
0	132550	193833	200517	175633	5,245	0,100	0,113
10	98243	71933	77890	82689	4,917	0,070	0,080
25	105017	99473	96363	100284	5,001	0,019	0,021
40	112367	100407	99010	103928	5,017	0,030	0,034
55	121033	104267	97458	107586	5,032	0,048	0,054
70	81992	108833	108167	99664	4,999	0,070	0,079
85	98705	105467	98065	100746	5,003	0,017	0,020
100	102240	102130	95400	99923	5,000	0,017	0,019
115	94162	87790	97128	93027	4,969	0,022	0,025
130	97598	97253	99040	97964	4,991	0,004	0,005

Tabela A16: Ensaio de luminescência para a amostra com concentração total de mercúrio de $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e logaritmo da atividade de -23,87.

<i>Tempo de irradiação (min)</i>	<i>Luminescência</i>					<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
	<i>Média 1º ensaio</i>	<i>Média 2º ensaio</i>	<i>Média 3º ensaio</i>	<i>Média</i>	<i>Log(média)</i>		
0	132550	193833	200517	175633	5,245	0,100	0,113
10	70737	75073	41657	62489	4,796	0,141	0,159
25	109933	98427	47365	85242	4,931	0,199	0,225
40	98392	99413	108077	101961	5,008	0,022	0,025
55	80592	103893	101262	95249	4,979	0,061	0,069
70	80662	95473	83620	86585	4,937	0,039	0,044
85	74492	104172	80902	86522	4,937	0,076	0,086
100	66906	101588	85580	84691	4,928	0,091	0,103
115	81290	105198	96977	94488	4,975	0,057	0,065
130	83123	70010	88447	80527	4,906	0,053	0,060

Tabela A17: Ensaio de luminescência para a amostra com concentração total de mercúrio de $1,2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e logaritmo da atividade de -23,79.

<i>Tempo de irradiação (min)</i>	<i>Luminescência</i>					<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
	<i>Média 1º ensaio</i>	<i>Média 2º ensaio</i>	<i>Média 3º ensaio</i>	<i>Média</i>	<i>Log(média)</i>		
0	132550	193833	200517	175633	5,245	0,100	0,113
10	74233	92790	40522	69182	4,840	0,186	0,211
25	71363	103030	61548	78647	4,896	0,115	0,130
40	105378	151650	50707	102578	5,011	0,242	0,274
55	81165	107817	32393	73792	4,868	0,273	0,309
70	102493	112117	65000	93203	4,969	0,127	0,144
85	78085	99208	58047	78447	4,895	0,117	0,132
100	70203	94900	55565	73556	4,867	0,117	0,132
115	106478	103060	46888	85476	4,932	0,202	0,228
130	65183	92448	41342	66324	4,822	0,175	0,198

Tabela A18: Ensaio de luminescência para a amostra com concentração total de mercúrio de $1,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e logaritmo da atividade de -23,69.

<i>Tempo de irradiação (min)</i>	<i>Luminescência</i>					<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
	<i>Média 1º ensaio</i>	<i>Média 2º ensaio</i>	<i>Média 3º ensaio</i>	<i>Média</i>	<i>Log(média)</i>		
0	132550	193833	200517	175633	5,245	0,100	0,113
10	42182	7593	5481	18418	4,265	0,476	0,539
25	4270	10381	5631	6761	3,830	0,197	0,223
40	5586	10913	5279	7259	3,861	0,175	0,199
55	6149	6098	5166	5804	3,764	0,043	0,048
70	5293	4079	4768	4713	3,673	0,057	0,064
85	6249	3405	3793	4482	3,651	0,141	0,159
100	6129	2928	2743	3933	3,595	0,194	0,219
115	7146	1898	1447	3497	3,544	0,371	0,420
130	7584	1388	1211	3394	3,531	0,444	0,502

Tabela A19: Ensaio de luminescência para a amostra com concentração total de mercúrio de $1,7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e logaritmo da atividade de -23,64.

<i>Tempo de irradiação (min)</i>	<i>Luminescência</i>					<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
	<i>Média 1º ensaio</i>	<i>Média 2º ensaio</i>	<i>Média 3º ensaio</i>	<i>Média</i>	<i>Log(média)</i>		
0	132550	193833	200517	175633	5,245	0,100	0,113
10	9338	1583	2048	4323	3,636	0,416	0,471
25	7547	1686	2760	3998	3,602	0,332	0,375
40	4662	1414	1213	2430	3,386	0,320	0,362
55	2365	843	1207	1472	3,168	0,227	0,257
70	1651	489	1445	1195	3,077	0,290	0,328
85	1235	342	1194	924	2,965	0,318	0,360
100	805	354	1168	775	2,890	0,265	0,300
115	589	284	599	491	2,691	0,185	0,209
130	435	238	544	406	2,608	0,185	0,210

Tabela A20: Ensaio de luminescência para a amostra com concentração total de mercúrio de $2,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e logaritmo da atividade de -23,57.

<i>Tempo de irradiação (min)</i>	<i>Luminescência</i>					<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
	<i>Média 1º ensaio</i>	<i>Média 2º ensaio</i>	<i>Média 3º ensaio</i>	<i>Média</i>	<i>Log(média)</i>		
0	132550	193833	200517	175633	5,245	0,100	0,113
10	9388	9097	8239	8908	3,950	0,030	0,033
25	5477	4528	3661	4555	3,658	0,087	0,099
40	1942	1884	1710	1846	3,266	0,029	0,033
55	1034	883	937	951	2,978	0,035	0,039
70	835	749	722	769	2,886	0,033	0,037
85	661	439	557	553	2,742	0,089	0,101
100	358	337	242	312	2,495	0,091	0,103
115	197	257	153	202	2,306	0,112	0,127
130	78	69	54	67	1,826	0,082	0,093

Tabela A21: Ensaio de luminescência para a amostra com concentração total de mercúrio de $4,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e logaritmo da atividade de -23,27.

<i>Tempo de irradiação (min)</i>	<i>Luminescência</i>					<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
	<i>Média 1º ensaio</i>	<i>Média 2º ensaio</i>	<i>Média 3º ensaio</i>	<i>Média</i>	<i>Log(média)</i>		
0	11942	25873	15265	17693	4,248	0,172	0,194
10	19,96	19,12	16,23	18,44	1,266	0,048	0,054
25	1,481	2,758	5,274	3,171	0,501	0,276	0,312
40	0,048	0,043	0,052	0,048	-1,323	0,041	0,046
55	0,048	0,043	0,052	0,048	-1,323	0,041	0,046
70	0,048	0,043	0,052	0,048	-1,323	0,041	0,046
85	0,048	0,043	0,052	0,048	-1,323	0,041	0,046
100	0,048	0,043	0,052	0,048	-1,323	0,041	0,046
115	0,048	0,043	0,052	0,048	-1,323	0,041	0,046
130	0,048	0,043	0,052	0,048	-1,323	0,041	0,046

Tabela A22: Ensaio de luminescência para a amostra com concentração total de mercúrio de $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e logaritmo da atividade de -22,96.

<i>Tempo de irradiação (min)</i>	<i>Luminescência</i>					<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
	<i>Média 1º ensaio</i>	<i>Média 2º ensaio</i>	<i>Média 3º ensaio</i>	<i>Média</i>	<i>Log(média)</i>		
0	16923	11768	13630	14107	4,149	0,079	0,090
10	1,453	0,775	0,655	0,961	-0,017	0,182	0,206
25	0,395	0,078	0,372	0,282	-0,550	0,401	0,454
40	0,042	0,042	0,042	0,042	-1,378	0,000	0,000
55	0,042	0,042	0,042	0,042	-1,378	0,000	0,000
70	0,042	0,042	0,042	0,042	-1,378	0,000	0,000
85	0,042	0,042	0,042	0,042	-1,378	0,000	0,000
100	0,042	0,042	0,042	0,042	-1,378	0,000	0,000
115	0,042	0,042	0,042	0,042	-1,378	0,000	0,000
130	0,042	0,042	0,042	0,042	-1,378	0,000	0,000

Tabela A23: Ensaio de luminescência para a amostra com concentração total de mercúrio de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e logaritmo da atividade de -22,17.

<i>Tempo de irradiação (min)</i>	<i>Luminescência</i>					<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
	<i>Média 1º ensaio</i>	<i>Média 2º ensaio</i>	<i>Média 3º ensaio</i>	<i>Média</i>	<i>Log(média)</i>		
0	5204	3849	1804	3619	3,559	0,237	0,268
10	0,415	0,221	0,189	0,275	-0,561	0,180	0,204
25	0,038	0,038	0,038	0,038	-1,416	0,000	0,000
40	0,038	0,038	0,038	0,038	-1,416	0,000	0,000
55	0,038	0,038	0,038	0,038	-1,416	0,000	0,000
70	0,038	0,038	0,038	0,038	-1,416	0,000	0,000
85	0,038	0,038	0,038	0,038	-1,416	0,000	0,000
100	0,038	0,038	0,038	0,038	-1,416	0,000	0,000
115	0,038	0,053	0,048	0,046	-1,416	0,000	0,000
130	0,038	0,053	0,048	0,046	-1,416	0,000	0,000

Tabela A24: Ensaio de luminescência para a amostra da Barra da água da Ria de Aveiro.

<i>Tempo de irradiação (min)</i>	<i>Luminescência</i>					<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
	<i>Média 1º ensaio</i>	<i>Média 2º ensaio</i>	<i>Média 3º ensaio</i>	<i>Média</i>	<i>Log(média)</i>		
0	75397	157540	139783	124240	5,094	0,172	0,194
10	141863	124547	85720	117377	5,070	0,114	0,129
25	142560	149773	128863	140399	5,147	0,033	0,038
40	140607	196117	106937	147887	5,170	0,132	0,149
55	100767	119150	127890	115936	5,064	0,053	0,060
70	97810	94747	95510	96022	4,982	0,007	0,008
85	92110	89817	83443	88457	4,947	0,022	0,025
100	95293	102860	59130	85761	4,933	0,130	0,147
115	125223	79063	70280	91522	4,962	0,133	0,150
130	115777	83647	74887	91437	4,961	0,098	0,111

Tabela A25: Ensaio de luminescência para a amostra da Murtosa da água da Ria de Aveiro.

<i>Tempo de irradiação (min)</i>	<i>Luminescência</i>					<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
	<i>Média 1º ensaio</i>	<i>Média 2º ensaio</i>	<i>Média 3º ensaio</i>	<i>Média</i>	<i>Log(média)</i>		
0	75397	157540	139783	124240	5,094	0,172	0,194
10	75397	157540	139783	124240	5,094	0,172	0,194
25	146517	174790	157557	159621	5,203	0,039	0,044
40	168933	142767	141617	151106	5,179	0,043	0,049
55	109007	146427	141127	132187	5,121	0,070	0,079
70	93063	73547	101660	89423	4,951	0,073	0,082
85	80760	93087	88353	87400	4,942	0,031	0,035
100	66643	67603	52780	62342	4,795	0,060	0,068
115	55053	73667	58943	62554	4,796	0,066	0,075
130	51197	74347	58173	61239	4,787	0,082	0,093

Tabela A26: Ensaio de luminescência para a amostra da Barra da água da Ria de Aveiro de controlo.

<i>Tempo de irradiação (min)</i>	<i>Luminescência</i>					<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
	<i>Média 1º ensaio</i>	<i>Média 2º ensaio</i>	<i>Média 3º ensaio</i>	<i>Média</i>	<i>Log(média)</i>		
0	237500	252167	252233	247300	5,393	0,015	0,017
10	231433	264067	245433	246978	5,393	0,029	0,032
25	223267	286167	236133	248522	5,395	0,057	0,064
40	229700	260500	241833	244011	5,387	0,027	0,031
55	196643	197860	197740	197414	5,295	0,001	0,002
70	193620	189833	196293	193249	5,286	0,007	0,008
85	187070	187727	199887	191561	5,282	0,016	0,018
100	190343	185067	225233	200214	5,301	0,046	0,052
115	183870	180300	246467	203546	5,309	0,076	0,086
130	196643	181063	243433	207047	5,316	0,066	0,075

Tabela A27: Ensaio de luminescência para amostra da Barra da água da Ria de Aveiro com adição de mercúrio de $1,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ e logaritmo da atividade de -24,25.

<i>Tempo de irradiação (min)</i>	<i>Luminescência</i>					<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
	<i>Média 1º ensaio</i>	<i>Média 2º ensaio</i>	<i>Média 3º ensaio</i>	<i>Média</i>	<i>Log(média)</i>		
0	237500	252167	252233	247300	5,393	0,015	0,017
10	195287	204583	218533	206134	5,314	0,025	0,028
25	195287	197277	197690	196751	5,294	0,003	0,003
40	190773	191630	191377	191260	5,282	0,001	0,001
55	187050	190163	183883	187032	5,272	0,007	0,008
70	181820	178680	177200	179233	5,253	0,006	0,006
85	177100	164000	166637	169246	5,229	0,018	0,020
100	169767	159780	158510	162686	5,211	0,016	0,018
115	149413	157820	151387	152873	5,184	0,012	0,014
130	146343	144040	147087	145823	5,164	0,005	0,005

Tabela A28: Ensaio de luminescência para amostra da Barra da água da Ria de Aveiro com adição de mercúrio de $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e logaritmo da atividade de -23,25.

<i>Tempo de irradiação (min)</i>	<i>Luminescência</i>					<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
	<i>Média 1º ensaio</i>	<i>Média 2º ensaio</i>	<i>Média 3º ensaio</i>	<i>Média</i>	<i>Log(média)</i>		
0	237500	252167	252233	247300	5,393	0,015	0,017
10	241500	229617	229617	233578	5,368	0,013	0,014
25	239067	236433	224656	233385	5,368	0,014	0,016
40	244600	237678	216231	232836	5,367	0,028	0,032
55	226767	237293	216169	226743	5,356	0,020	0,023
70	233067	204417	206417	214633	5,332	0,032	0,036
85	219433	181133	182617	194394	5,289	0,047	0,053
100	213633	191467	168915	191338	5,282	0,051	0,058
115	211393	197678	136783	181951	5,260	0,102	0,115
130	197597	188768	123417	169927	5,230	0,113	0,128

Tabela A29: Ensaio de luminescência para amostra da Barra da água da Ria de Aveiro com adição de mercúrio de $5,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ e logaritmo da atividade de -22,56.

<i>Tempo de irradiação (min)</i>	<i>Luminescência</i>					<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
	<i>Média 1º ensaio</i>	<i>Média 2º ensaio</i>	<i>Média 3º ensaio</i>	<i>Média</i>	<i>Log(média)</i>		
0	237500	252167	252233	247300	5,393	0,015	0,017
10	231433	205733	236867	224678	5,352	0,033	0,037
25	233500	206417	191467	210461	5,323	0,044	0,049
40	208767	186433	165008	186736	5,271	0,051	0,058
55	199637	181133	163032	181267	5,258	0,044	0,050
70	196643	167083	168915	177547	5,249	0,040	0,045
85	172060	149417	165150	162209	5,210	0,032	0,036
100	161873	136783	161567	153408	5,186	0,042	0,048
115	151450	121200	158800	143817	5,158	0,063	0,071
130	114513	105067	156417	125332	5,098	0,091	0,103

Tabela A30: Ensaio de luminescência para amostra da Barra da água da Ria de Aveiro com adição de mercúrio de $1,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e logaritmo da atividade de -22,25.

<i>Tempo de irradiação (min)</i>	<i>Luminescência</i>					<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
	<i>Média 1º ensaio</i>	<i>Média 2º ensaio</i>	<i>Média 3º ensaio</i>	<i>Média</i>	<i>Log(média)</i>		
0	237500	252167	252233	247300	5,393	0,015	0,017
10	204417	219783	181133	201778	5,305	0,042	0,048
25	181217	148740	106933	145630	5,163	0,116	0,131
40	182617	134767	88575	135319	5,131	0,158	0,179
55	172067	123417	78515	124666	5,096	0,171	0,194
70	156433	113150	74202	114595	5,059	0,162	0,184
85	133833	105050	64948	101277	5,006	0,160	0,181
100	106417	83535	52220	80724	4,907	0,157	0,178
115	91493	75550	33718	66921	4,826	0,230	0,260
130	60767	48785	26475	45342	4,657	0,187	0,212

Tabela A31: Ensaio de luminescência para amostra da Barra da água da Ria de Aveiro com adição de mercúrio de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e logaritmo da atividade de -21,56.

<i>Tempo de irradiação (min)</i>	<i>Luminescência</i>					<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
	<i>Média 1º ensaio</i>	<i>Média 2º ensaio</i>	<i>Média 3º ensaio</i>	<i>Média</i>	<i>Log(média)</i>		
0	237500	252167	252233	247300	5,393	0,015	0,017
10	196233	173583	113217	161011	5,207	0,125	0,142
25	157127	107713	79672	114837	5,060	0,148	0,167
40	121683	97495	35705	84961	4,929	0,284	0,321
55	93663	71848	9932	58481	4,767	0,533	0,603
70	35913	53125	8525	32521	4,512	0,418	0,473
85	16000	13135	8180	12438	4,095	0,150	0,169
100	10630	9710	7838	9392	3,973	0,068	0,077
115	8705	6213	7490	7469	3,873	0,073	0,083
130	5364	3044	7176	5195	3,716	0,189	0,214

Tabela A32: Ensaio de luminescência para amostra da Barra da água da Ria de Aveiro com adição de mercúrio de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e logaritmo da atividade de -21,25.

<i>Tempo de irradiação (min)</i>	<i>Luminescência</i>					<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
	<i>Média 1º ensaio</i>	<i>Média 2º ensaio</i>	<i>Média 3º ensaio</i>	<i>Média</i>	<i>Log(média)</i>		
0	237500	252167	252233	247300	5,393	0,015	0,017
10	100943	64230	186550	117241	5,069	0,232	0,263
25	87992	20247	99118	69119	4,840	0,384	0,435
40	62922	10273	35698	36298	4,560	0,403	0,456
55	33672	6501	9860	16678	4,222	0,371	0,420
70	21212	5405	7459	11359	4,055	0,310	0,351
85	10527	3320	4698	6182	3,791	0,257	0,291
100	8853	2755	3092	4900	3,690	0,279	0,316
115	6500	1069	2368	3312	3,520	0,393	0,445
130	2367	944	1060	1457	3,163	0,217	0,246

Tabela A33: Ensaio de luminescência para amostra da Barra da água da Ria de Aveiro com adição de mercúrio de $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e logaritmo da atividade de -20,56.

<i>Tempo de irradiação (min)</i>	<i>Luminescência</i>					<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
	<i>Média 1º ensaio</i>	<i>Média 2º ensaio</i>	<i>Média 3º ensaio</i>	<i>Média</i>	<i>Log(média)</i>		
0	248,4	290,9	308,0	282,5	2,451	0,048	0,055
10	148,3	208,1	185,9	180,8	2,257	0,075	0,085
25	1,459	0,405	0,567	0,811	-0,091	0,289	0,327
40	0,146	0,034	0,027	0,069	-1,159	0,396	0,448
55	0,035	0,034	0,027	0,032	-1,493	0,059	0,066
70	0,035	0,034	0,027	0,032	-1,493	0,059	0,066
85	0,035	0,034	0,027	0,032	-1,493	0,059	0,066
100	0,035	0,034	0,027	0,032	-1,493	0,059	0,066
115	0,035	0,034	0,027	0,032	-1,493	0,059	0,066
130	0,035	0,034	0,027	0,032	-1,493	0,059	0,066

Tabela A34 Ensaio de luminescência para amostra da Barra da água da Ria de Aveiro com adição de mercúrio de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e logaritmo da atividade de -20,25.

<i>Tempo de irradiação (min)</i>	<i>Luminescência</i>					<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
	<i>Média 1º ensaio</i>	<i>Média 2º ensaio</i>	<i>Média 3º ensaio</i>	<i>Média</i>	<i>Log(média)</i>		
0	53,47	68,28	79,64	67,13	1,827	0,087	0,099
10	0,107	0,442	0,584	0,378	-0,423	0,396	0,448
25	0,070	0,027	0,030	0,042	-1,374	0,228	0,258
40	0,027	0,027	0,030	0,028	-1,553	0,025	0,028
55	0,027	0,027	0,030	0,028	-1,553	0,025	0,028
70	0,027	0,027	0,030	0,028	-1,553	0,025	0,028
85	0,027	0,027	0,030	0,028	-1,553	0,025	0,028
100	0,027	0,027	0,030	0,028	-1,553	0,025	0,028
115	0,027	0,027	0,030	0,028	-1,553	0,025	0,028
130	0,027	0,027	0,030	0,028	-1,553	0,025	0,028

Tabela A35: Ensaio de luminescência para amostra da Barra da água da Ria de Aveiro com adição de mercúrio de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e logaritmo da atividade de -19,25.

<i>Tempo de irradiação (min)</i>	<i>Luminescência</i>					<i>Desvio padrão</i>	<i>Intervalo de confiança</i>
	<i>Média 1º ensaio</i>	<i>Média 2º ensaio</i>	<i>Média 3º ensaio</i>	<i>Média</i>	<i>Log(média)</i>		
0	1,531	1,984	1,847	1,787	0,252	0,058	0,066
10	0,397	0,046	0,049	0,164	-0,785	0,532	0,602
25	0,049	0,046	0,049	0,048	-1,319	0,013	0,014
40	0,049	0,046	0,049	0,048	-1,319	0,013	0,014
55	0,049	0,046	0,049	0,048	-1,319	0,013	0,014
70	0,049	0,046	0,049	0,048	-1,319	0,013	0,014
85	0,049	0,046	0,049	0,048	-1,319	0,013	0,014
100	0,049	0,046	0,049	0,048	-1,319	0,013	0,014
115	0,049	0,046	0,049	0,048	-1,319	0,013	0,014
130	0,049	0,046	0,049	0,048	-1,319	0,013	0,014